Aus der Biochemischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstitutes
Direktor: Prof. Dr. H. Reinauer

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON AMINOPEPTIDASEN AUS DER SKELETTMUSKULATUR DER RATTE

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Adelheid Jacobs-Sturm
1982

Aus der Biochemischen Abteilung des Diabetes-
Forschungsinstitutes
Direktor: Prof. Dr. H. Reinauer

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON AMINOPEPTIDASEN AUS DER SKELETTMUSKULATUR DER RATTE

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Adelheid Jacobs-Sturm
1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Reinauer

Koreferent
gez.: Prof. Dr. Staib

INHALTSVERZEICHNIS

I.		EINLEITUNG	6
II.		MATERIAL	11
	1.	Tiere	11
	2.	Chemikalien	11
III.		METHODEN	13
	1.	Methoden der Enzymmessung	13
	1.1	Aminopeptidasen - Aktivität	14
	1.2	Endopeptidasen - Aktivität	15
	2.	Proteinbestimmung	17
	3.	Herstellung des Rohextraktes	17
	4.	Chromatographische Verfahren	17
	4.1	Ionenaustauschchromatographie	18
	4.2	Gelfiltration an Sephadex G-150	18
	4.3	Gelfiltration an Sepharose 6B	18
	4.4	Molekulargewichtsbestimmung	19
	5.	Elektrophoresen	19
	5.1	Disk - Elektrophorese	20
	5.2	SDS - Elektrophorese	20
	5.3	Isoelektrische Fokussierung	21
	5.4	Protein- und enzymspezifische Nachweismethoden in Acrylamidgelen	22
IV.		ERGEBNISSE	24
	1.	Untersuchungen im Rohextrakt	24
	1.1	Einfluß des Extraktionsmediums	24
	1.2	Stabilität der Aminopeptidasen	25
	1.3	Einfluß des pH - Wertes	28

IV.	1.4	Einfluß von Tris - Ionen auf die AANA - Aminopeptidase	28
	1.5	Zeitabhängigkeit	29
	1.6	Einfluß der Temperatur	30
	2.	Reinigung der LNA - Aminopeptidase	31
	2.1	Reinigungsschema	31
	2.2	Anionenaustauschchromatographie	31
	2.3	Gelfiltration an Sephadex G-150	33
	2.4	Gelfiltration von A2 und A3 an Sepharose 6B	34
	2.5	Reinigungsfaktoren der LNA - Aminopeptidasen	36
	2.6	Reinheitsprüfung der LNA - Aminopeptidasen	36
	3.	Charakterisierung der LNA - Aminopeptidasen	39
	3.1	Isoelektrische Fokussierung	39
	3.2	Einfluß des pH - Wertes	40
	3.3	Kinetische Daten der LNA - Spaltung	41
	3.4	Spaltspezifität	43
	3.5	Einfluß von Aktivatoren und Inhibitoren	44
	3.5.1	Metallionen	44
	3.5.2	SH- und SS - Reagenzien	44
	3.5.3	PMSF und 1,10-Phenanthrolin	47
	3.6	Molekulargewichtsbestimmung	48
	3.7	SDS - Elektrophoresen	50
	3.8	Assoziation von A2	53
	3.9	Chromatographie des Rohextraktes an Sepharose 6B	55
	4.	Reinigung der AANA - Aminopeptidase	57
	4.1	Reinigungsschema	57
	4.2	Anionenaustauschchromatographie	57

IV.	4.3	Rechromatographie an DEAE Sephadex A-50	58
	4.4	Chromatographie an Sephadex G-150	59
	4.5	Reinigungsfaktoren der AANA - Aminopeptidase	60
	4.6	Reinheitsprüfung der AANA - Aminopeptidase	60
	5.	Charakterisierung der AANA - Aminopeptidase	62
	5.1	Isoelektrische Fokussierung	62
	5.2	Einfluß des pH - Wertes	63
	5.3	Kinetik der AANA - Aminopeptidase	63
	5.4	Spaltspezifität	65
	5.5	Einfluß von Aktivatoren und Inhibitoren	65
	5.5.1	Kationen	65
	5.5.2	SH- und SS - Reagenzien	67
	5.5.3	PMSF und 1,10-Phenanthrolin	67
	5.6	Molekulargewichtsbestimmung	68
	5.7	SDS - Elektrophorese	68
V.		DISKUSSION	72
	1.	Vergleich der Aminopeptidasen im Rohextrakt	72
	2.	LNA - Aminopeptidasen	73
	3.	AANA - Aminopeptidase	82
VI.		ZUSAMMENFASSUNG	87
VII.		LITERATURVERZEICHNIS	89

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

Enzyme

AAP	Alaninaminopeptidase
DAP	Dipeptidylaminopeptidase
LAP	Leucinaminopeptidase

Substrate

AANA	L-Alanyl-L-alanin-4-nitroanilid
ANA	L-Alanin-4-nitroanilid
ATNA	N-Acetyl-tyrosin-4-nitroanilid
BANA	N^{α}-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid
LNA	L-Leucin-4-nitroanilid
4-NA	4-Nitroanilid

Effektoren

DFP	Diisopropylfluorphophorsäureester
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
MCE	2-Mercaptoäthanol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

Sonstige

DMF	Dimethylformamid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure

I. EINLEITUNG

Während der vergangenen Jahre ist der Muskelproteinstoffwechsel in zunehmendem Maße Gegenstand der biochemischen Forschung geworden. Wie die Proteine in anderen Geweben unterliegen auch die Muskelproteine einem ständigen Auf- und Abbau, bezüglich ihrer Halbwertszeiten sind bislang allerdings sehr unterschiedliche Angaben gemacht worden (Waterlow et al., 1978). Für den Abbauvorgang müssen somit spezifisch wirkende und regulierbare intrazelluläre Proteinasen bereitstehen.

Proteolytische Aktivität in Muskelhomogenaten wurde bereits von Anson (1938, 1940) unter Verwendung von Hämoglobin als Substrat nachgewiesen. Die meisten Arbeiten in der Folgezeit befaßten sich mit der Untersuchung und Reinigung von Endopeptidasen, welche entsprechend ihrem Aktivitätsmaximum in saure sowie neutrale und alkalische Proteinasen eingeteilt wurden.

Demgegenüber sind die Untersuchungen von Carboxypeptidasen und Aminopeptidasen in der Muskulatur äußerst spärlich und lückenhaft. Dabei spielt sicherlich eine Rolle, daß die Exopeptidasenaktivität im Muskel verglichen mit anderen Geweben sehr niedrig ist. Als erster wies Smith (1948) darauf hin, daß Extrakte von Kaninchen- und Rattenskelettmuskel sowie von Kaninchenherz und -uterus Aminopeptidasenaktivität besitzen, da die Substrate Leu-Gly und Leu-Gly-Gly bei pH 7,8 - 8,0 hydrolysiert wurden und die Hydrolaseaktivität durch 1mM Mn^{2+} stimuliert werden konnte, beides sind Charakteristika der Leucinaminopeptidase [EC 3.4.11.1].

Unter Verwendung von Aminosäureamiden und synthetischen Aminosäurederivaten wurden in der Folgezeit eine Reihe von Exopeptidasen in der Muskulatur nachgewiesen. Es wurde postuliert, daß die Aminopeptidasen der Skelettmuskulatur eine wichtige Rolle spielen sowohl im permanenten Muskelproteinstoffwechsel (Bury & Pennington, 1973; Kar & Pearson, 1976) als auch bei Muskelatrophie nach vorausgegangener Denervierung (Pluskal & Pennington, 1973) sowie bei der postmortalen Muskelautolyse (Otsuka et al., 1976). Untersuchungen von Dahlmann und Mitarbeitern (1979) über die proteolytische Aktivität in der Skelettmuskulatur diabetischer Ratten haben nachgewiesen, daß die Aminopeptidasenaktivität im Muskel auch im diabetischen Zustand erhöht ist.

Über die Eigenschaften der Aminopeptidasen aus der Skelettmuskulatur ist bis heute nur wenig bekannt. Josef & Sanders (1966) isolierten eine Aminopeptidase, welche Leucinamid spaltete, aus Schweinemuskelextrakten und konnten zeigen, daß ihre Eigenschaften ähnlich denen der bereits recht gut charakterisierten Nierenleucinaminopeptidase [EC 3.4.11.1] waren. In der Folgezeit gelang es, die Aminopeptidasenaktivität sowohl aus der menschlichen (Bury & Pennigton, 1976) als auch aus der Rattenskelettmuskulatur (Parsons & Pennington, 1976) durch Anionenaustauschchromatographie in mehrere enzymatisch aktive Fraktionen aufzutrennen, die sich durch ihre Spaltspezifität voneinander unterschieden. Ebenfalls mittels Chromatographie am Anionenaustauscher gelang Bury und Mitarbeitern (1977) die Trennung von zwei Aminopeptidasen aus dem Herzmuskel der Ratte; die beiden Enzyme unterscheiden sich aufgrund ihres Molekular-

gewichtes voneinander, weisen jedoch ansonsten recht ähnliche Eigenschaften auf. Parsons et al. (1979) unternahmen in einer neueren Arbeit den Versuch, die durch Anionenaustauschchromatographie voneinander getrennten Enzyme aus dem Skelettmuskel der Ratte zu charakterisieren. Leider ist die Zuordnung der angegebenen Daten zu bereits bekannten Aminopeptidasen aus anderen Geweben kaum möglich, da keinerlei Angaben über die Reinheit der Enzympräparation gemacht wurden; die Autoren selbst vermerken, daß eine weitere Reinigung der Enzyme erforderlich sei wegen wahrscheinlicher Verunreinigung sowohl mit Dipeptidylaminopeptidasen als auch mit Di- und Tripeptidasen sowie Carboxypeptidasen.

Die vollständige Reinigung einer Aminopeptidase aus Kaninchenskelettmuskel wurde von Otsuka et al. (1976, 1980) beschrieben. Das Enzym, welches ohne Zusatz von 2-Mercaptoäthanol keine Aktivität zeigte, wies ein pH-Optimum im neutralen Bereich auf und spaltete bevorzugt Tripeptide und größere Oligopeptide.

Eine eigene Gruppe innerhalb der Aminopeptidasen bilden die Dipeptidylaminopeptidasen (DAP), welche von der unsubstituierten terminalen Aminogruppe eines Proteinmoleküls oder eines Peptids Dipeptide abspalten. Bislang sind in tierischen und menschlichen Geweben vier derartige Enzyme beschrieben worden (McDonald et al., 1971), wobei DAP I und DAP II maximale Hydrolasenaktivität im sauren pH - Bereich aufweisen und wahrscheinlich lysosomalen Ursprungs sind, während DAP III und DAP IV ein Aktivitätsmaximum im alkalischen Bereich aufweisen. Bezüglich der Funktion dieser Enzyme wurde postuliert, daß

DAP I und DAP II gemeinsam mit anderen lysosomalen Enzymen eine wichtige Rolle bei der Proteolyse in den Lysosomen spielen (McDonald et al., 1971). Von der DAP II wurde außerdem berichtet, daß der Serumspiegel dieses Enzyms bei thromboembolischen Erkrankungen, Myokardinfarkt, Diabetes mellitus und Alkoholismus erhöht ist (Vanka-Perttula & Kalliomäki, 1973).

Daß Muskelhomogenate Dipeptidylaminopeptidasen enthalten, konnte anhand der Hydrolyse von Gly-Phe-NH_2 (Bouma & Gruber, 1964; Lutalo-Bosa & MacRae, 1969) gezeigt werden; dieses Substrat wird durch Cathepsin C [EC 3.4.14.1], welches sich als identisch mit DAP I erwies, gespalten. McDonald und Mitarbeiter (1971) konnten anhand spezifischer Substrate nachweisen, daß wäßrige Extrakte von Rattenskelettmuskel alle vier bekannten Dipeptidylaminopeptidasen enthalten. Auch im Herzmuskel der Ratte wurde eine schwache Dipeptidylaminopeptidasenaktivität nachgewiesen, welche DAP I entspricht (Hopsu-Havu & Ekfors, 1969). Allerdings sind die DAP - Aktivitäten im Muskel verglichen mit anderen Geweben sehr gering (McDonald et al., 1971).

Mittels Chromatographie am Anionenaustauscher gelang es, sowohl im menschlichen (Bury & Pennington, 1975) als auch im Rattenskelettmuskel (Parsons & Pennington, 1976) die DAP - Aktivität in drei Fraktionen mit unterschiedlicher Substratspezifität aufzutrennen, welche allerdings z.T. auch Aminopeptidasenaktivität aufwiesen; eine Reinigung oder Charakterisierung der Dipeptidylaminopeptidasen aus der Skelettmuskulatur wurde bislang noch nicht beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aminopeptidasenaktivität, die sich in der Skelettmuskulatur der Ratte anhand der Hydrolyse von L-Leucin-4-nitroanilid und L-Alanyl-L-alanin-4-nitroanilid nachweisen läßt, möglichst weitgehend zu reinigen und zu charakterisieren sowie einen Vergleich anzustellen mit bereits bekannten Aminopeptidasen aus anderen Geweben, um auf diesem Wege weiteren Einblick in den Proteinstoffwechsel der Muskulatur zu gewinnen.

II. MATERIAL

II.1 Tiere

Als Versuchsobjekt dienten männliche und weibliche Ratten des Wistar - HaN - Stammes (Firma Winkelmann, Bochum) mit einem Körpergewicht von 250 - 400g.

II.2. Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

E.Merck, Darmstadt:

L-Leucin-4-nitroanilid

L-Tyrosin-4-nitroanilid

L-Lysin-4-nitroaniliddihydrobromid

L-Alanin-4-nitroanilidhydrochlorid

L-Prolin-4-nitroanilidhydrochlorid

L-Alanyl-L-alanin-4-nitroanilid

Glycyl-L-alanin-4-nitroanilid

Glutaryl-L-phenylalanin-4-nitroanilid

N-Acetyl-L-tyrosin-4-nitroanilid

N^{α}-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilidhydrochlorid

Dithiothreitol

4-Chlorquecksilberbenzoat

2-Mercaptoäthanol

Serva, Heidelberg:

Chymotrypsinogen

Myoglobin vom Pferd

γ-Globulin, human (Cohn-Fraktion II)

Eialbumin

Serumalbumin vom Schwein

Ferritin

Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel [EC 2.7.1.40]

Kreatinkinase aus Kaninchenmuskel [EC 2.7.3.2]

Aldolase aus Kaninchenmuskel [EC 4.1.2.13]

Azocasein

L-Glycin-4-nitroanilid

L-Phenylalanin-4-nitroanilid

Sigma, München:

Thyreoglobulin

1,10-Phenanthrolin

Pharmacia, Uppsala, Schweden:

DEAE - Sephadex A-50

Sephadex G-150

Sepharose 6B

Dade, Miami, U.S.A.:

Lab - Trol Proteinstandard

Bio Rad, München:

SDS - PAGE Standards für hohes und niedriges Molekulargewicht.

Alle weiteren, hier nicht genannten Chemikalien wurden von den Firmen E.Merck, Darmstadt und Serva, Heidelberg bezogen.

III. METHODEN

III.1. Methoden der Enzymbestimmung

Die Enzyme, die am Proteinabbau beteiligt sind, lassen sich in zwei große Gruppen einteilen:

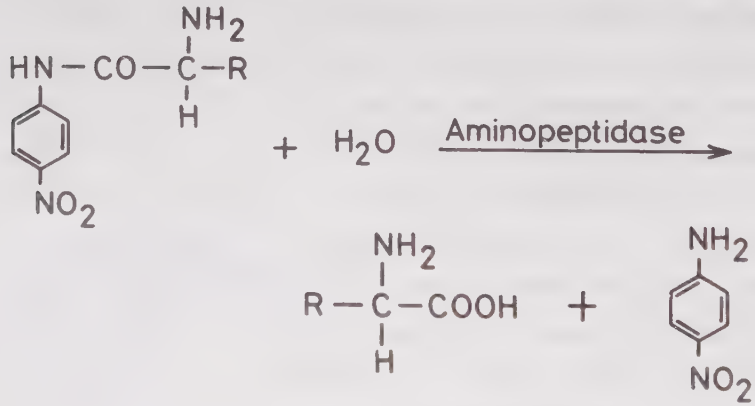
a) Endopeptidasen, die - entsprechend ihrer Spaltspezifität - Peptidbindungen inmitten größerer Proteinmoleküle hydrolysieren, aber auch esterolytische Aktivität gegenüber Aminosäureestern (Bergmann, 1942) sowie Amidasenaktivität gegenüber z.B. Aminosäureaniliden (Erlanger, 1961) aufweisen. Mit natürlichen Substraten erfaßt man die gesamte proteolytische Aktivität, während die Verwendung synthetischer Präparate eine Klassifizierung der Endopeptidasen schon im Rohhomogenat ermöglicht.

b) Exopeptidasen, die von den Enden eines Polypeptids oder eines Proteinmoleküls Mono-, Di- und Oligopeptide abspalten. Entsprechend ihrem Angriffsort werden die Exopeptidasen unterteilt in Carboxypeptidasen, welche vom Carboxylende her hydrolysieren, Aminopeptidasen, deren Angriffspunkt das Aminoende des Proteins ist und Dipeptidasen, die Dipeptide hydrolysieren. Bei Verwendung von synthetischen, 'chromogenen' Aminosäurederivaten, deren Spaltstücke gefärbt sind, anstelle der natürlichen Amide wird statt der Bezeichnung 'Aminopeptidasen' auch der Begriff 'Arylamidasen' verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus der Klasse der Exopeptidasen die Aminopeptidasen untersucht, welche die Substrate LNA, ANA und AANA hydrolysieren.

III.1.1 Aminopeptidasen - Aktivität

Zur Messung der Aminopeptidasenaktivität bieten die Aminosäure-4-nitroanilide gegenüber den meisten anderen synthetischen Substraten große Vorteile bezüglich Empfindlichkeit, Spezifität sowie Einfachheit und Reproduzierbarkeit der Messungen (Tuppy et al., 1962). Während der enzymatischen Hydrolyse wird die Säureamidbindung gespalten und das gelb gefärbte 4-Nitroanilin freigesetzt; die Hydrolyse läßt sich durch Messung der Extinktionsänderung bei 405nm photometrisch verfolgen.



Zur routinemäßigen Messung der Aminopeptidasenaktivität wurden folgende Substrate verwendet:

L-Leucin-4-nitroanilid (LNA) und L-Alanin-4-nitroanilid (ANA) für Aminopeptidasen,

L-Alanyl-L-alanin-4-nitroanilid (AANA) für die Dipeptidylaminopeptidase.

Die Konzentrationen der Substratlösungen waren wie folgt:

LNA: 1,0mM in 10mM Tris/HCl/5% DMF, pH 7,2;

ANA: 1,0mM in 10mM Tris/HCl/5% DMF, pH 7,2;

AANA: 1,0mM in H_2O/5% DMF, pH 5,5.

Der Testansatz, bestehend aus 200 µl Enzymlösung und 200 µl Substratlösung wurde für 30 - 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 300 µl 8% TCA wurde die Reaktion gestoppt, nach Zentrifugation der Probe bei 11000g für 3 Minuten wurde im Überstand das freigesetzte 4-Nitroanilin bei 405nm gemessen.

Gemäß dem Lambert - Beerschen Gesetz ist die Extinktionsänderung der Menge des freigesetzten 4-Nitroanilins proportional, daraus läßt sich die Enzymaktivität berechnen:

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \times \frac{V}{v \times d \times \varepsilon} \quad [\mu\text{Mol/ml/min}]$$

ΔE = Extinktionsänderung

t = Inkubationszeit [min]

V = Volumen des Testansatzes [ml]

v = Probevolumen [ml]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

ε = Extinktionskoeffizient;

für 4-Nitroanilin: $\varepsilon_{405} = 9{,}62\ cm^2/\mu Mol$ (Wachsmuth et al., 1966). Alle Aktivitäten sind - wenn nicht anders vermerkt - in nMol/ml/h angegeben.

III.1.2 Endopeptidasen - Aktivität

Zum Nachweis der proteolytischen Endopeptidasenaktivität wurde als Substrat Azocasein verwendet. Im Azocasein sind die aroma-

tischen Aminosäuren des Caseins über Azobindung mit Sulfanilamid gekoppelt.

Meßansatz: 50 µl Azocasein (3% in 50mM Tris/HCl, pH 8,5)
200 µl Enzymlösung.

Die Inkubation erfolgte 1 - 2 Stunden bei 37°C, anschließend wurde das unverdaute Substrat durch Zugabe von 500 µl 8% TCA ausgefällt. Nach Zentrifugation (5 min bei 11000g) wurde die Menge der enzymatisch freigesetzten Spaltpeptide im Überstand anhand ihrer Absorption bei 366nm im Eppendorf - Photometer gemessen.

Eine Enzymeinheit ist definiert als die Enzymmenge, die unter den gegebenen Bedingungen eine Extinktionsänderung von $\Delta E = 0{,}001/\text{min}$ verursacht.

Zusätzlich zu der Messung mit Azocasein wurde die Endopeptidasenaktivität auch mit folgenden Substraten gemessen:

N^{α}-Benzoyl-L-tyrosin-4-nitroanilid (BANA) für tryptische Enzyme und

N-Acetyl-L-tyrosin-4-nitroanilid (ATNA) für chymotryptische Enzyme.

Die Konzentrationen der Substratlösungen waren wie folgt:

BANA: 3,0mM in 10mM Tris/HCl/5% DMF, pH 7,2;

ATNA: 3,0mM in 10mM Tris/HCl/5% DMF, pH 7,2.

Die Testausführung und die Aktivitätsberechnung erfolgten wie bereits bei den Exopeptidasen unter III.1.1 beschrieben.

III.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Proben wurde nach Lowry und Mitarbeitern (1951) oder nach der Biuret - Methode bestimmt, dabei wurde als Proteinstandard jeweils eine Verdünnungsreihe von Lab - Trol - Kontrollserum mit bekanntem Proteingehalt mitgeführt. Bei allen chromatographischen Schritten wurde der Proteingehalt der Einzelfraktionen durch Messung der Absorption bei 280nm ermittelt.

III.3 Herstellung des Rohextraktes

Die Tötung der Tiere erfolgte in Äthernarkose. Die Muskulatur der Hinterbeine wurde rasch herauspräpariert, von anhaftendem Fett und Bindegewebe gesäubert, kurz mit Aqua dest. abgespült und mit einer Präparierschere zerkleinert. Das so vorbereitete Muskelgewebe wurde mit dem 10-fachen Volumen eiskalten Extraktionsmittels in einem MSE - Homogenisator bei 14000 Upm eine Minute lang homogenisiert, dabei wurde das Homogenisationsgefäß mit Eiswasser gekühlt. Das Homogenat wurde durch ein Sieb gegossen und unter Rühren 12h bei $4^{\circ}C$ extrahiert.
Nach Beendigung der Extraktion wurde das Homogenat in der Kühlzentrifuge (Sorvall RC-2B) 30 min bei 15000g und $2^{\circ}C$ zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Seidengaze (Porengröße 25µ) filtriert. Aus diesem Filtrat wurden die Aminopeptidasen isoliert.

III.4. Chromatographische Verfahren

Alle chromatographischen Experimente wurden bei 4 - $6^{\circ}C$ im Kühlraum ausgeführt.

III.4.1 Ionenaustauschchromatographie

Zur Trennung der Proteine wurde DEAE Sephadex A-50 verwendet. Das Vorbereiten der Gele und das Packen der Säulen (6 x 30 cm) erfolgte nach Firmenvorschrift (Pharmacia), vor der Probenaufgabe wurden die Säulen mit dem Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,2) äquilibriert. Die Proben wurden absteigend mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 60 ml/h chromatographiert, 18 ml - Fraktionen wurden im Fraktionssammler (LKB, Stockholm) gesammelt. Nach dem Spülen mit Elutionspuffer wurden die an das Gel gebundenen Proteine mit zwei verschiedenen KCl - Stufen (0,14; 0,3M KCl) eluiert.

III.4.2 Gelfiltration an Sephadex G - 150

Das Gel wurde gemäß der Firmenvorschrift (Pharmacia) gequollen, das Packen der Säule (3 x 107 cm) erfolgte nach Determann (1967) unter leicht erhöhtem Arbeitsdruck. Die Säule wurde mit dem Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,2 und 0,2M KCl) äquilibriert. Die Chromatographie erfolgte absteigend bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 11,5 ml/h. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 2 ml, Fraktionen von je 6,4 ml wurden gesammelt. Das Ausschlußvolumen der Säule wurde mit Dextranblau ermittelt (V_o = 160 ml).

III.4.3 Gelfiltration an Sepharose 6B

Die Chromatographievorbereitungen entsprachen denen für Sephadex G - 150 (s. III.4.2). Aufgetragen wurden jeweils 500 µl Probe. Die Säule (1,5 x 95 cm) wurde mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 14,6 ml/h eluiert, und 2,4 ml - Fraktionen wurden

gesammelt. Die Bestimmung des Ausschlußvolumens (V_o = 60 ml) erfolgte auch hier mit Dextranblau.

III.4.4 Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde an der unter III.4.3 bereits beschriebenen Sepharose 6B - Säule ausgeführt. Zur Eichung der Säule (Determann, 1967) wurden jeweils 500 µl Proteinlösung zusammen mit 50 µl 2% Dextranblaulösung chromatographiert. Folgende Proteine wurden zur Eichung verwendet, ihre Molekulargewichte sind in Klammern angegeben: 1,4 mg Chymotrypsinogen (25000), 2 mg Eialbumin (45000), 3 mg Kreatinkinase (80000), 3 mg γ-Globulin (150000), 2 mg Pyruvatkinase (237000), 2,3 mg Ferritin (450000) und 4,2 mg Thyreoglobulin (660000) je in 500 µl Elutionspuffer gelöst. Sämtliche Elutionsvolumina wurden durch ihre Absorption bei 280nm photometrisch ermittelt.
Die Molekulargewichte der gereinigten Enzyme (je 500 µl Enzymlösung zusammen mit 50 µl Dextranblaulösung wurden aufgetragen) wurden über die Elutionsvolumina, welche durch die Spaltung von Aminosäure-4-nitroaniliden bestimmt wurden, mit Hilfe der Eichgraden berechnet.

III.5 Elektrophoresen

Die Disk- und SDS - Elektrophoresen erfolgten - sofern nicht anders angegeben - in einer Rundgelelektrophoresekammer von DESAGA (Heidelberg) mit einem Stromgeber von LKB (Power supply 2103).

III.5.1 Disk - Elektrophoresen

a) Makrodiskelektrophoresen wurden in Glasröhrchen (10 cm x 4,5 mm) gemäß den Angaben von Maurer (1968) unter Verwendung von 7,5% Acrylamidgelen ausgeführt (Maurer - System Nr.6; Konzentrierung bei pH 7,0; Trennung bei pH 8,0). Als Elektrodenpuffer diente Diäthylbarbitursäure/Tris, pH 7,0; die Frontmarkierung erfolgte mit 0,05% Bromphenolblaulösung. Die Stromstärke betrug 4mA/Gel, die Trenndauer war 100 min bei 4°C.

b) Mikrodiskelektrophoresen erfolgten in Glaskapillaren (10 cm x 1 mm) ebenfalls nach der Vorschrift von Maurer (1968), diesmal unter Verwendung des Systems Nr.1 (7,5% Acrylamidgel, Konzentrierung bei pH 8,3; Trennung bei pH 9,5). Der Elektrodenpuffer bestand aus Tris/Glycin, pH 8,3; die Frontmarkierung erfolgte wieder mit 0,05% Bromphenolblaulösung. Die Stromstärke betrug 2mA/Gel bei einer Trenndauer von 90 min bei 4°C.

III.5.2 SDS - Elektrophorese

Die SDS - Elektrophorese wurde nach zwei verschiedenen Methoden durchgeführt:

a) nach der Vorschrift von Weber und Osborn (1969) mit 10% Acrylamidgelen; zur Aufstellung einer Eichkurve für die Molekulargewichtsbestimmung wurden folgende Proteine (Molekulargewichte in Klammern) verwendet: Myoglobin vom Pferd (17800), Chymotrypsinogen (25000), Aldolase vom Kaninchen (40000), Eialbumin (45000), Pyruvatkinase vom Kaninchen (57000) und Rinderserumalbumin (68000). Die Dissoziation der Proteine in ihre Untereinheiten erfolgte durch Zugabe eines gleichen Volumens von Probenpuffer, enthaltend 1% SDS/1% MCE und Inkubation bei 37°C

für 2h.

Während der Elektrophorese betrug die Stromstärke 8mA/Gel bei einer Trenndauer von 5h. Als Referenzsubstanz diente Bromphenolblau (0,05%). Die Mobilität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$M = \frac{a}{b} \times \frac{c}{d}$$

a = Länge des ungefärbten Gels

b = Position von Bromphenolblau

c = Position der gefärbten Proteinbande

d = Länge des gefärbten Gels.

b) nach den Angaben von Porzio und Pearson (1977) in 10% Acrylamidgelen als Flachgelelektrophorese; zur Aufstellung einer Eichkurve wurden die SDS - PAGE Standards für hohes und niedriges Molekulargewicht (Bio Rad) verwendet. Vor der Elektrophorese wurden die Enzyme 5 Minuten bei 100°C in 1mM DTT/1% SDS mit 5mM EDTA erhitzt, dann über 12h dialysiert gegen 25 mM Tris/Glycin/0,2% SDS mit 1mM DTT, pH 7,4. Die Elektrophorese (Kammer: DESAGA, System HAVANA) dauerte 15h bei einer Gesamtstromstärke von 15mA; zur Frontmarkierung wurde Bromphenolblau (0,05%) verwendet.

III.5.3 Isoelektrische Fokussierung

Die analytische isoelektrische Fokussierung erfolgte auf Ampholine PAG - Platten, käuflich bei LKB mit einem Gradienten von pH 3,5 - 9,5. Als Elektrophoresekammer wurde die Multiphorappa-

ratur von LKB verwendet. Die Elektrophorese sowie die proteinspezifische Anfärbung der Platten mit Coomassie Brilliant Blue R - 250 wurden gemäß den Firmenangaben vorgenommen (enzymspezifischer Nachweis s. III.5.4.b).

III.5.4 Protein- und enzymspezifische Nachweise in Acrylamidgelen

a) Proteinspezifische Anfärbung:

Die Proteinbanden wurden entsprechend den Angaben von Filho & de Azevedo Moreira (1978) sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele 12h mit 0,005% Coomassie Brilliant Blue R - 250/22% Methanol/ 9% Eisessig gefärbt; die Entfärbung erfolgte während 24h in 5% Methanol/7,5% Eisessig; danach wurden die Proben in 7,5% Eisessig aufbewahrt.

b) enzymspezifische Anfärbung:

Sofort nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in 5 mm breite Scheiben geschnitten und in Reaktionshütchen der Firma Eppendorf zusammen mit je 500 µl Substratlösung (1mM LNA bzw. 1mM AANA) bei 37°C über 12h inkubiert. Der Anteil des freigesetzten 4-Nitroanilins wurde bei 405nm photometrisch gemessen (s.III.1.1).

III.5.5 Messung des Einflusses von Aktivatoren und Inhibitoren

Für jedes Enzym und jeden Zusatz wurden die folgenden Inkubationsansätze hergestellt:

a) 100 µl Enzymlösung + 100 µl Puffer (Doppelmessung) = Kontrolle

b) 100 µl Enzymlösung + 100 µl Effektorlösung (Doppelmessung)

c,d) Blindwerte zu a) und b).

Die obigen Testansätze wurden jeweils 30 min bei 25°C zur Reaktion stehengelassen, anschließend die Aktivität gemäß III.1.1 bestimmt; sämtliche Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Vorinkubationsansätze.

IV. ERGEBNISSE

IV.1. Untersuchungen im Rohextrakt

IV.1.1 Einfluß des Extraktionsmediums

Die Aminopeptidasen wurden - wie unter III.3. beschrieben - mit verschiedenen Extraktionsmitteln aus der Muskulatur extrahiert und ihre Aktivität quantitativ bestimmt.

Tab. 1: Einfluß des Extraktionsmediums

Extraktionsmittel	LNA	AANA	ANA	Azocasein	Protein [g] / Muskel [g]
	[nMol/mg/h]			[U/mg]	
50mM Tris/HCl, pH 8,5 + 1M KCl	103	6	81	0,87	0,115
50mM Tris/HCl, pH 8,5 + 1M KCl + 2% Triton	27	11	32	-	0,131
10mM Tris/HCl, pH 7,2	248	260	431	0	0,034
H_2O	242	249	330	0	0,022

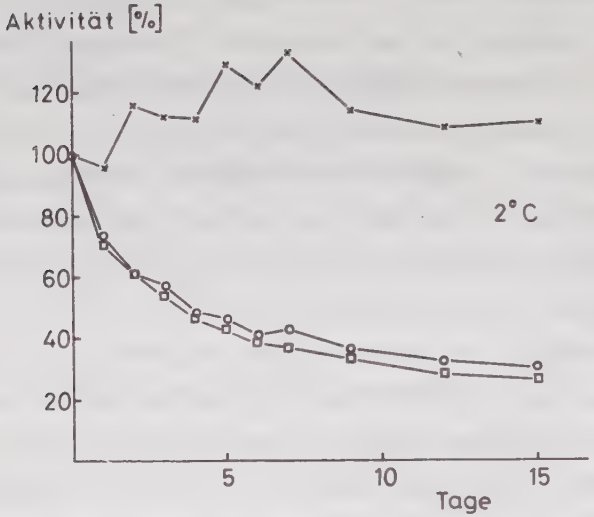
Aus der Tabelle 1 geht deutlich hervor, daß Extraktionsmedien, die eine Solubilisierung der myofibrillären Proteine bewirken,

wie sie zur Isolierung alkalischer Endopeptidasenaktivität in der Muskulatur verwendet wurden (Dahlmann & Reinauer, 1978), zur Isolierung der vorliegenden Aminopeptidasen nicht geeignet sind, die Ausbeute an Exopeptidasenaktivität ist in Relation zum Proteingehalt zu gering. Zusatz von Triton X-100 führte zu großen Aktivitätsverlusten bei der LNA- und der ANA - Aminopeptidase; die AANA - spaltende Enzymaktivität hingegen stieg gering an, doch nahm auch der Gehalt an Protein zu.
Entschieden günstiger ist das Verhältnis Enzymaktivität : Protein bei Verwendung von 10 mM Tris/HCl - Puffer, pH 7,2 oder H_2O als Extraktionsmedium. Gegenüber den vorherigen Puffern ist in diesen Medien ein deutlicher Aktivitätsanstieg bei den Aminopeptidasen zu beobachten, während der Anteil des inaktiven Proteins, das mit in Lösung geht, erheblich geringer ist. Für die Reinigung der Aminopeptidasenaktivität aus dem Muskel wurde als Extraktionsmedium Tris - Puffer (10mM, pH 7,2) gewählt.

IV.1.2 Stabilität der Aminopeptidasen im Rohextrakt

Die Stabilität der Aminopeptidasen in 10mM Tris - Puffer bei pH 7,2 wurde bei -20°C und bei 2°C Aufbewahrungstemperatur getestet. Abb. 1 zeigt die Veränderung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Zeit. Innerhalb von 5 Tagen waren die Aktivitäten der LNA- und der ANA - Aminopeptidasen bei 2°C bereits auf 45% abgesunken, bei -20°C ging die Aktivität auf 52% des Ausgangswertes zurück. Die AANA - Aminopeptidase hingegen zeigte bei beiden Temperaturen eine leichte Aktivitätszunahme.

Die weiteren Messungen zeigten, daß die LNA- und die ANA - Aminopeptidase bei 2°C sehr instabil



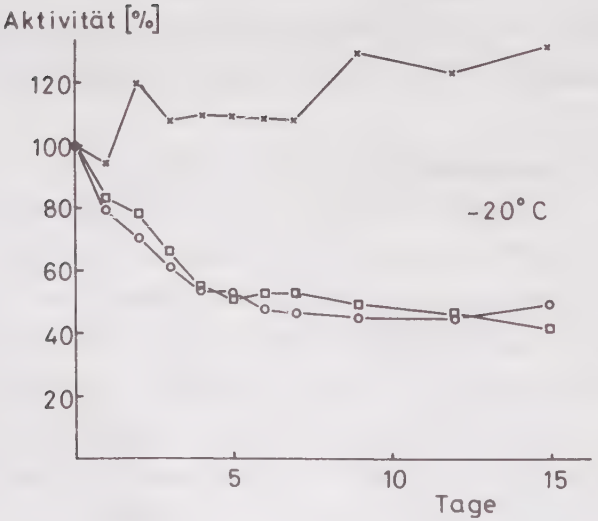


Abb. 1: Stabilität der Aminopeptidasen im Rohextrakt

o: LNA □: ANA ×: AANA

waren, nach 15 Tagen waren die Aktivitäten beider Enzyme auf 30 bzw. 26% abgesunken, während bei -20°C die Stabilität etwas besser war, da die Restaktivitäten noch 40 bzw. 50% des Ausgangswertes betrugen. Die AANA - Aminopeptidase erwies sich als das stabilste Enzym, sowohl bei 2°C als auch bei -20°C lag die Aktivität um 10 - 20% über dem Ausgangswert.
Diese Messungen machen zugleich deutlich, daß während der Reinigung der LNA - Aminopeptidase, die ca. 5 Tage dauerte, schon fast 50% des Enzyms aufgrund mangelnder Stabilität verloren gingen. Die AANA - Aminopeptidase bietet hingegen aufgrund ihrer Stabilität gute Voraussetzungen zur Isolierung.

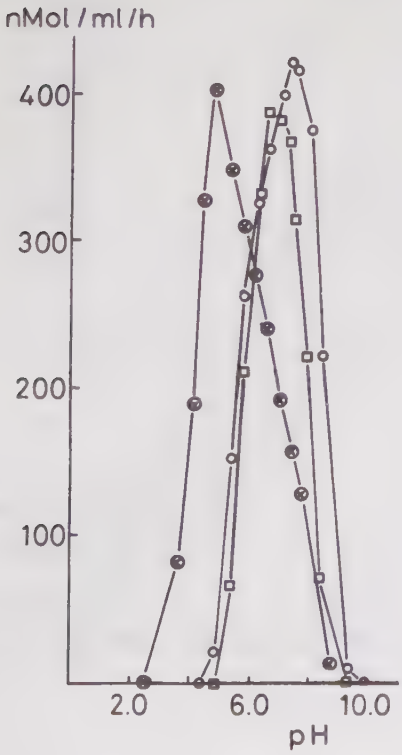


Abb. 2: Enzymaktivität in Abhängigkeit vom pH - Wert
Als Puffer wurde Phosphat/Borat/Zitrat/HCl des je gewünschten pH - Wertes verwendet (Teorell & Stenhagen, 1938)
o: LNA □: ANA
⊛: AANA

IV.1.3 Einfluß des pH - Wertes

Die Hydrolyse von LNA zeigte ein Maximum im neutralen Bereich zwischen pH 6,5 - 8,0, während ANA optimal zwischen pH 6,3 - 7,5 hydrolysiert wurde. Die AANA - Spaltung hingegen war am größten im sauren Bereich zwischen pH 4,5 - 6,0 (Abb. 2).

IV.1.4 Einfluß von Tris - Ionen auf die AANA - Aminopeptidase

Im niedrigen Konzentrationsbereich bis 10mM übten Tris - Ionen keinen Einfluß auf die AANA - Aminopeptidase aus, höhere Kon-

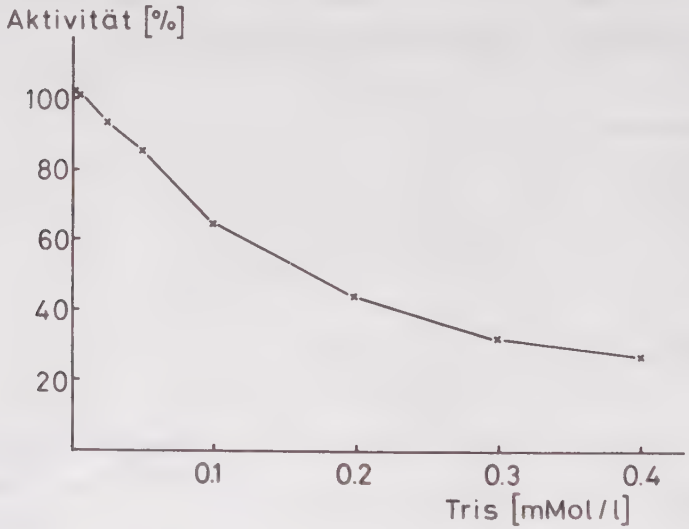


Abb. 3: Einfluß von Tris - Ionen auf die AANA - Aminopeptidase
5 ml Rohextrakt wurden gegen das je 10-fache Volumen H_2O für insgesamt 72h bei 2°C dialysiert, dann die Aktivität nach Zusatz von Tris - Ionen in verschiedener Konzentration gemessen (je pH 5,5); ×: AANA.

zentrationen hingegen führten zu zunehmender Hemmung; bei 50mM Tris im Ansatz zeigte das Enzym eine Restaktivität von 86%, während bei 200 mM Tris die Aktivität bereits auf 44% des Kontrollwertes abgesunken war (Abb. 3).

IV.1.5 Zeitabhängigkeit

Abb. 4 zeigt die Zeit - Umsatz - Kurve für die Hydrolyse der Substrate LNA, ANA und AANA bei 37°C. Die Hydrolyse der 4-Nitroanilide verlief unter den gegebenen Bedingungen über einen Zeitraum von mindestens 15 Minuten linear entsprechend einer Reaktion 0.Ordnung.

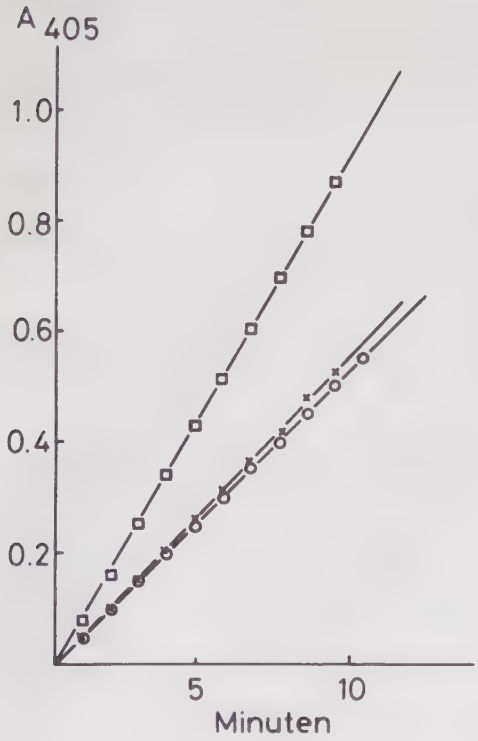


Abb. 4: Zeitabhängigkeit
o: LNA □: ANA
×: AANA

IV.1.6 Einfluß der Temperatur

Die Enzymaktivität nahm mit steigender Temperatur zu. LNA und ANA wurden - bei einer Inkubationszeit von 15 min - maximal bei 45°C hydrolysiert, oberhalb dieser Temperatur erfolgte aufgrund der Wärmedenaturierung eine rasche Inaktivierung der beiden neutralen Aminopeptidasen. Als optimale Inkubationstemperatur für die AANA - Aminopeptidase erwies sich 55°C, bei Temperaturen oberhalb dieses Optimums nahm die Enzymaktivität rasch ab (Abb. 5).

Abb. 5: Einfluß der Temperatur
o: LNA, □: ANA
×: AANA

IV.2. Reinigung der LNA - Aminopeptidase

IV.2.1 Reinigungsschema

Die einzelnen Reinigungsschritte sind schematisch in Abb. 6 zusammengestellt.

Rattenskelettmuskelhomogenat in 10-fachem Volumen Tris - Puffer

↓

Extraktion bei 2°C über 12h

↓

Zentrifugation bei 10000g, 30 min;
Überstand

↓

Anionenaustauschchromatographie (DEAE Sephadex A-50)

↓

Gelfiltration an Sephadex G-150

↓

Gelfiltration an Sepharose 6B

Abb. 6: Reinigungsschema der LNA - Aminopeptidase

IV.2.2 Anionenaustauschchromatographie

Der klare, rötlich gefärbte Rohextrakt wurde an DEAE Sephadex A-50 chromatographiert; Abb. 7 zeigt das Elutionsdiagramm der Ionenaustauschersäule. Mit den ersten 100 rötlich gefärbten Fraktionen wurden große Mengen kathodischer Proteine von der Säule gewaschen. Die Aminopeptidasen wurden durch stufenweise Spülung der Säule mit 0,14M KCl und 0,3M KCl, beide in Tris -

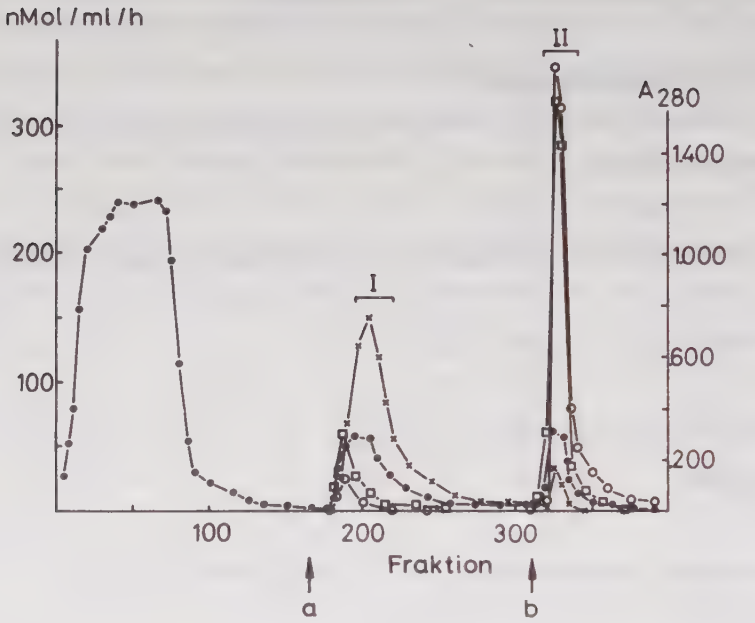


Abb. 7: Chromatographie an DEAE Sephadex A-50

a) Elution mit 0,14M KCl/10 mM Tris/HCl, pH 7,2;

b) Elution mit 0,3M KCl/10 mM Tris/HCl, pH 7,2;

•: A_{280} o: LNA □: ANA ×: AANA.

Die Klammern I und II zeigen die Fraktionen an, die gepoolt wurden.

Puffer eluiert. Die Fraktionen der 0,3M KCl - Stufe, die LNA hydrolysierten, wurden gepoolt und mittels Ammoniumsulfatfällung konzentriert. Dazu wurde die Enzymlösung bei 2°C mit $(NH_4)_2SO_4$ bis zu einem Sättigungsgrad von 80% versetzt. Die ausgefällten Proteine wurden in der Kühlzentrifuge (Sorvall, RC-2B) bei

10000g für 30 min abzentrifugiert, in 10 - 15 ml Tris - Puffer aufgenommen und erneut zur Abtrennung unlöslichen Materials für 10 min bei 15000g zentrifugiert.

IV.2.3 Gelfiltration an Sephadex G-150

Die konzentrierte Enzymlösung wurde an Sephadex G-150 chromatographiert. Wie aus Abb. 8 ersichtlich, wurde die LNA - spaltende Aktivität in drei verschiedenen Peaks isoliert, welche sich durch ihr Molekulargewicht voneinander unterschieden. Peak A3 erschien bereits im Ausschlußvolumen der Säule, d.h. das

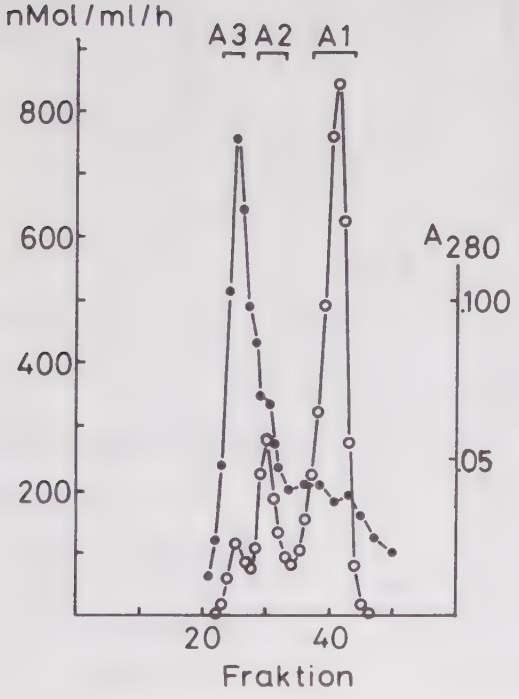


Abb. 8: Gelfiltration an Sephadex G-150

•: A_{280} o: LNA

Die Klammern A1, A2 und A3 zeigen die Fraktionen an, die gepoolt wurden.

Molekulargewicht muß größer sein als 100000. Endopeptidasenaktivität mit Azocasein als Substrat ließ sich in keiner Fraktion nachweisen.

Die aktiven Fraktionen eines jeden Peaks wurden gepoolt und in einer Amicon - Zelle (Fa. Amicon, Lexington, U.S.A.) über einer YM - 10 Membran jeweils auf ein kleines Volumen konzentriert.

IV.2.4 Gelfiltration von A2 und A3 an Sepharose 6B

Die LNA - Aminopeptidasen A2 und A3 wurden durch Chromatographie an Sephrose 6B weiter gereinigt. Je 500 µl konzentrierte Probe

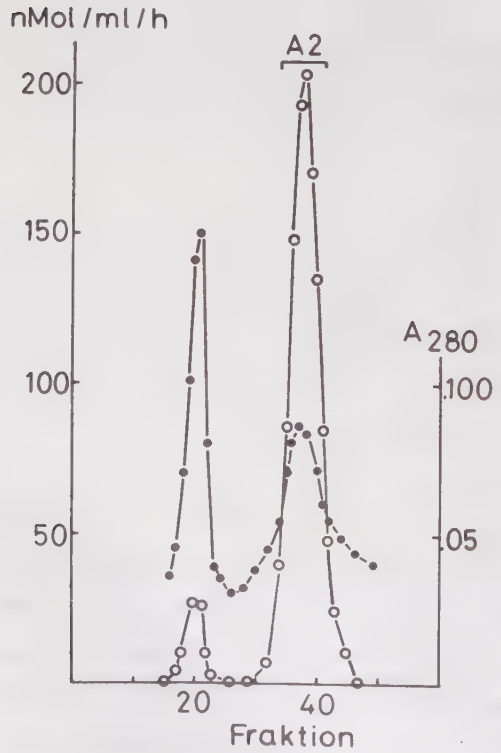


Abb. 9: Gelfiltration von A2 an Sepharose 6B

•: A_{280} ○: LNA

Die Klammer A2 gibt die Fraktionen an, die gepoolt wurden.

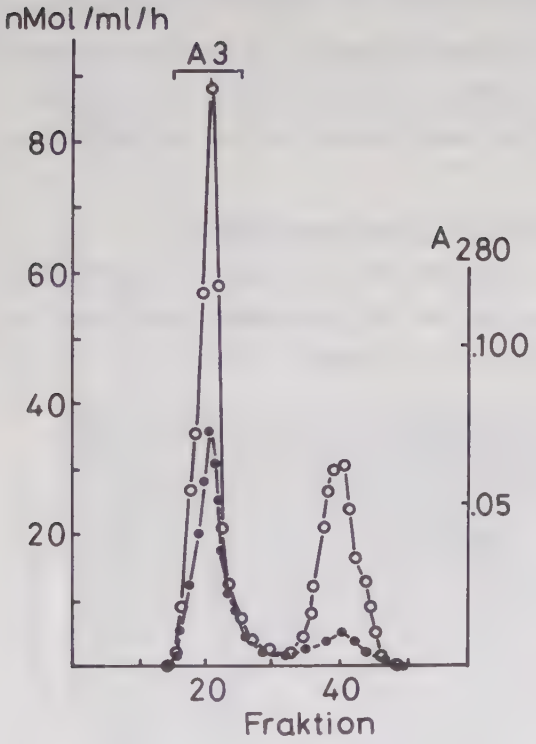


Abb. 10: Gelfiltration von A3 an Sepharose 6B
•: A_{280} o: LNA
Die Klammer A3 gibt die Fraktionen an, die gepoolt wurden.

wurden absteigend chromatographiert; die Abb. 9 und 10 zeigen die Elutionsprofile. A3 wurde als einheitlicher Peak im Ausschlußvolumen der Säule eluiert, eine restliche Verunreinigung durch A2 erschien deutlich abgetrennt bei V_e = 96 ml; analoges gilt - im umgekehrten Verhältnis - für die Reinigung von A2.
Die aktiven Fraktionen von A2 und A3 wurden jeweils gepoolt (s. Abb. 9 und 10) und durch Ultrafiltration konzentriert.

IV.2.5 Reinigungsfaktoren der LNA - Aminopeptidasen

Tab. 2 faßt die Reinigungsfaktoren der einzelnen Reinigungsschritte für die LNA - Aminopeptidasen zusammen. Im Vergleich zum Rohhomogenat stiegen die spezifischen Aktivitäten bei A3 um das 21-fache, bei A2 um das 101-fache und bei A1 um das 347-fache.

IV.2.6 Reinheitsprüfung der LNA - Aminopeptidasen

Die Reinheit der Enzyme wurde mit Hilfe der Disk - Elektrophorese überprüft. Die Abb. 11 zeigt, daß A2 als einheitliche Bande zur Anode wanderte, während A3 in zwei Formen zerfiel: eine kleine,

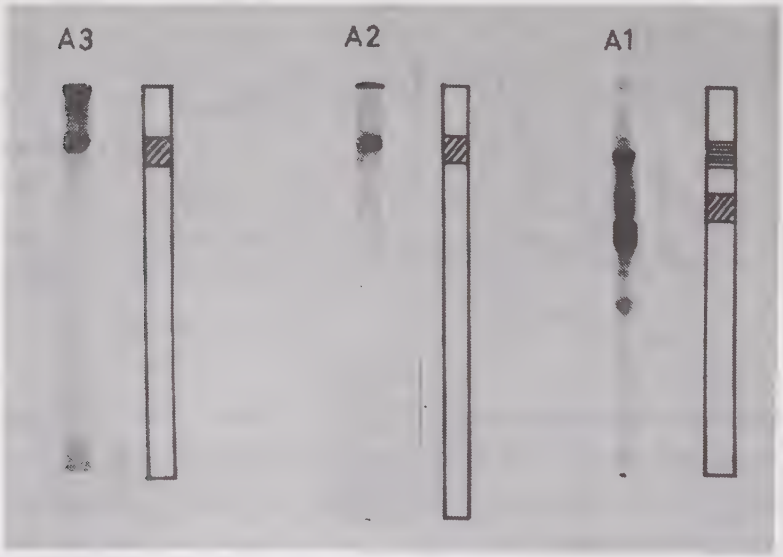


Abb. 11: Disk - Elektrophorese der Aminopeptidasen A1, A2 und A3
je linke Seite: Anfärbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue
je rechte Seite: Nachweis der enzymatischen Aktivität (s.III.5.4); ⁂: LNA ▪: AANA

Tab. 2: Reinigungsfaktoren der LNA - Aminopeptidasen

Reinigungsschritt	Protein [mg]	ges. Aktivität [µMol/h]	spez. Aktivität [µMol/mg/h]	Reinigung [-fach]	Ausbeute [%]
Muskelhomogenat	4111,8	483,5	0,12	1	100
Rohextrakt	1630,5	391,6	0,24	2	81
DEAE Sephadex A-50, Peak III	74,7	333,6	4,5	37	69
80% Sediment (nach Zentrifugation)	38,2	309,2	8,1	67	64
Sephadex G-150: A1	2,9	120,6	41,6	347	25
A2	3,7	38,7	10,5	87	8
A3	4,4	10,7	2,4	20	2
Sepharose 6B: A2	2,8	33,8	12,1	101	7
A3	3,8	9,6	2,5	21	2

enzymatisch inaktive Proteinmenge blieb auf dem Sammelgel liegen, während der größere Teil identisch mit A2 zur Anode wanderte (Abb. 11). Die mit LNA nachgewiesene Enzymaktivität fand sich an der gleichen Stelle wie die mit Coomassie angefärbte Proteinbande. Die Disk - Elektrophorese von A1 wies in der Coomassie - Färbung mehrere Banden auf, eine davon besaß Hydrolasenaktivität gegenüber LNA, während eine weitere AANA spaltete (Abb. 11). Demnach ist die LNA - Aminopeptidase A1 noch mit AANA - Aminopeptidase sowie einem weiteren Protein verunreinigt, die beiden Aminopeptidasen lassen sich aber durch ihre Spaltspezifität voneinander unterscheiden.

Zur weiteren Charakterisierung von A1 wurde jeweils nur die Elutionsfraktion verwendet, die die maximale Aktivität bei der Chromatographie an Sepharose 6B zeigte.

IV.3 Charakterisierung der LNA - Aminopeptidasen

IV.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Die analytische isoelektrische Fokussierung der LNA - Aminopeptidase A2 ist in Abb. 12a dargestellt, der isoelektrische Punkt des Enzyms lag bei pH 5,2 ± 0,2. Auch von A1 wurde der isoelektrische Punkt bestimmt, der pH 4,9 ± 0,1 betrug (Abb. 11b). A3 konnte aus Mangel an Material in dieser Hinsicht nicht untersucht werden.

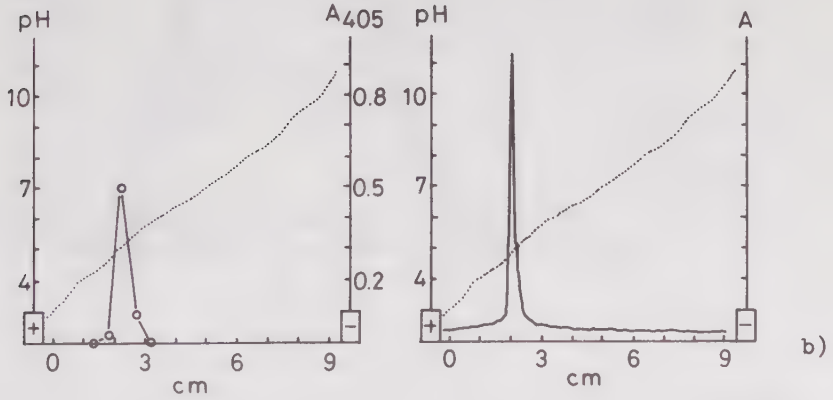


Abb. 12: Isoelektrische Fokussierung

a) Fokussierung von A2; die Bestimmung des isoelektrischen Punktes erfolgte durch Hydrolyse von LNA; o: LNA

b) Fokussierung von A1; die Anfärbung des Gels erfolgte durch Coomassie Brilliant Blue R-150, danach wurde ein Densitogramm aufgenommen; — : Protein.

IV.3.2 Einfluß des pH - Wertes

In Abb. 13 ist die Hydrolyseaktivität der LNA - Aminopeptidasen in Abhängigkeit vom pH - Wert des Testansatzes dargestellt. Alle drei Enzyme wiesen einen breiten optimalen Aktivitätsbereich zwischen pH 6,2 - 8,0 auf, gegenüber dem Rohextrakt trat keinerlei Verschiebung des pH - Optimums auf.

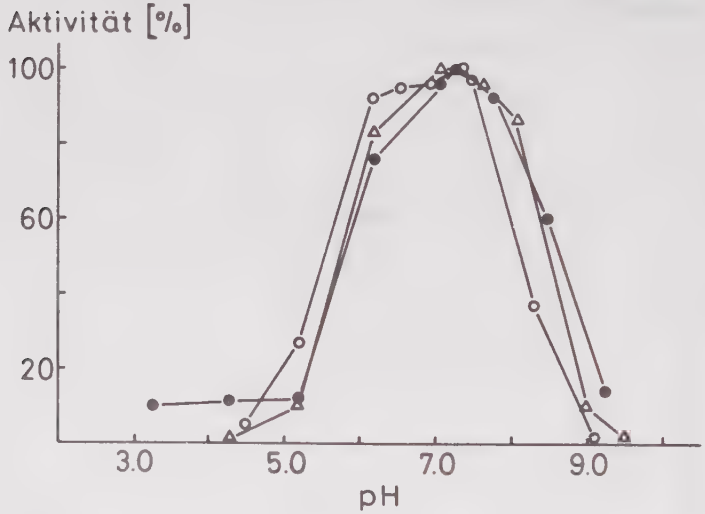


Abb. 13: Einfluß des pH - Wertes
Die proteolytische Aktivität in Abhängigkeit vom pH - Wert wurde in Phosphat/Borat/Zitrat/HCl - Puffer des je gewünschten pH - Wertes (Teorell & Stenhagen, 1938) mit LNA als Substrat gemessen; o: A1, ●: A2, Δ: A3.

IV.3.3 Kinetische Daten der LNA - Spaltung

Die Aktivitäten der drei LNA - Aminopeptidasen wurden in Gegenwart von 10 - 0,008 mM LNA bei 4 - 6 verschiedenen Proteinkonzentrationen gemessen. Die Berechnung der K_m - Werte erfolgte mit Hilfe des LINEWEAVER - BURK Plots, die Werte sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Das Substratoptimum der LNA - Aminopeptidasen lag bei 1mM LNA, bei höherer Substratkonzentration nahm die Enzymaktivität wieder ab.

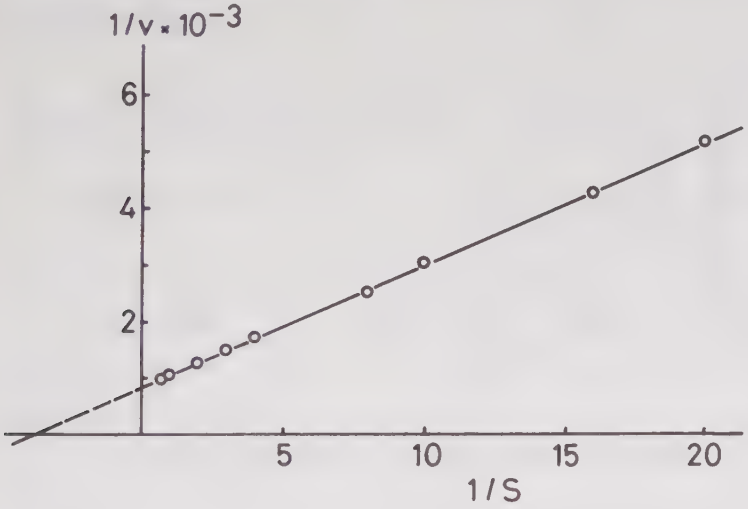


Abb. 14:
a) A1

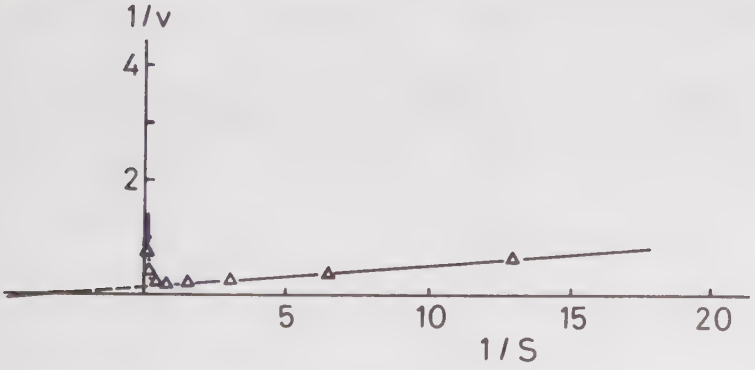


Abb. 14:
b) A3

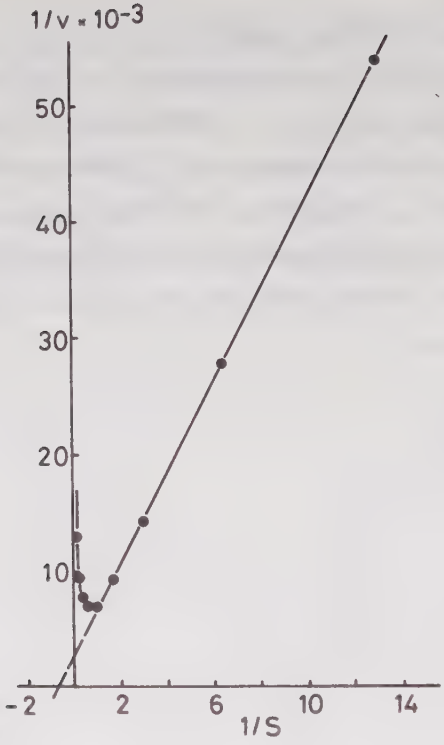


Abb. 14:
c) A2

Abb. 14: LINEWEAVER - BURK Plot für das Substrat LNA

Tab. 3: Kinetische Daten der LNA - Spaltung

Aminopeptidase	K_m [mM]	v_{max} [nMol/min/mg]
A3	0,32	8
A2	1,42	375
A1	0,26	1220

IV.3.4 Spaltspezifität

Die relativen Hydrolyseraten einiger Aminosäure-4-nitro - anilide durch die drei LNA - Aminopeptidasen sind in Tabelle 4 angegeben. Alle drei Enzyme wiesen die höchste Hydrolaseaktivität gegenüber Leu-4-NA auf, in abnehmender Rate gefolgt von Lys-4-NA > Ala-4-NA > Tyr-4-NA > Phe-4-NA > Gly-4-NA. Sowohl gegenüber Azocasein als auch gegenüber BANA und ATNA konnte nach zweistündiger Inkubation bei 37°C keine Hydrolyseaktivität gefunden werden.

Tab. 4: Spaltspezifität der LNA - Aminopeptidasen

Aminosäure-4-NA	rel. Aktivität [%]		
	A1	A2	A3
Leu-	100	100	100
Ala-	49	17	23
Gly-	2	2	2
Pro-	0	1	1
Phe-	34	7	12
Tyr-	33	14	19
Lys-	92	31	28
Acetyl-Tyr-	-	0	0
Benzoyl-Arg-	0	0	0
Azocasein	0	0	0

IV.3.5 Einfluß von Aktivatoren und Inhibitoren

Bei den folgenden Untersuchungen wurde die Aktivitätsbestimmung gemäß III.5.5 mit 1mM LNA als Substrat vorgenommen.

IV.3.5.1 Metallionen

Wie die meisten Enzyme wurden auch die LNA - Aminopeptidasen in ihrer Aktivität durch Metallionen beeinflußt, die Meßergebnisse sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Die Erdalkalimetallionen ebenso wie Mn^{2+} steigerten die Aktivität von A2 und A3, während sie auf A1 einen hemmenden Einfluß ausübten. Co^{2+} in geringer Konzentration (1mM) aktivierte alle drei Enzyme, in hoher Konzentration (10mM) hingegen wirkte es inhibierend. Eine starke Inaktivierung aller drei Enzyme trat nach Zusatz von Zn^{2+}, Cu^{2+} und Fe^{2+} auf.

IV.3.5.2 SH- und SS - Reagenzien

Sind am katalytischen Mechanismus eines Enzyms SH - Gruppen beteiligt, so tritt eine starke Hemmung der Enzymaktivität nach Zugabe von pCMB ein, da dieses Reagenz die SH - Gruppen blokkiert. Wie aus Tabelle 6 zu entnehmen ist, wurde bei allen drei LNA - Aminopeptidasen fast völlige Hemmung durch pCMB erreicht. Für A1 konnte gezeigt werden, daß die Hemmung mit pCMB durch Zugabe von MCE größtenteils reversibel war, d.h. das Quecksilber des pCMB wird von der für die Aktivität des Enzyms wichtigen SH - Gruppe verdrängt.

Die Zugabe von DTT führte bei A1 zu einer 11,5-fachen Steigerung der Enzymaktivität, während A2 nicht beeinflußt wurde. Thiole wie DTT oder MCE wirken als Reduktionsmittel, sie reduzieren

Tab. 5: Einfluß von Metallionen

Metallsalz	Konz. [mM]	rel. Aktivität [%]		
		A1	A2	A3
ohne	--	100	100	100
$MgCl_2$	1	87	104	106
	10	35	132	142
$CaCl_2$	1	71	128	128
	10	46	142	154
$MnCl_2$	1	78	118	127
	10	0	148	131
$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$	1	0	51	--
	10	3	15	--
$CoCl_2$	1	202	147	137
	10	74	80	--
$CuSO_4$	1	0	11	--
	10	0	12	--
$ZnCl_2$	1	0	0	0
	10	0	1	0

Tab. 6: Einfluß von SH- und SS - Reagenzien

Reagenz	Konz. [mM]	rel. Aktivität [%]		
		A1	A2	A3
ohne	-	100	100	100
pCMB	1	18	1	6
DTT	3	1148	102	195
MCE	1	127	--	159
pCMB + MCE	je 1	81	--	--

Disulfidbrücken in Proteinen zu Sulfhydrylgruppen:

Bei Verwendung von Monothiolen wie MCE liegen die Gleichgewichtskonstanten für die Austauschreaktion nahezu bei 1, sodaß ein großer Thiolüberschuss zum quantitativen Reaktionsablauf benötigt wird. Setzt man hingegen Dithiole wie z.B. DTT ein, welche bei der Oxidation in stabile cyclische Disulfide übergehen, so liegt das Gleichgewicht stärker auf der rechten Seite der Reaktionsgleichung (Means & Feeney, 1971). Die Addition von MCE zeigte daher wie zu erwarten einen geringeren aktivierenden Effekt auf A3 und A1 als DTT.

IV.3.5.3 PMSF und 1,10-Phenanthrolin

Enzyme, die durch Sulfonylfluoride oder organische Phosphorsäureester in ihrer Aktivität gehemmt werden, bezeichnet man als Serinproteinasen, da diese Inhibitoren mit der Hydroxylgruppe des Serins im aktiven Zentrum des Enzyms reagieren (Hartley, 1960). Bei Verwendung von PMSF ist zu berücksichtigen, daß dieses Reagenz auch Thiolproteinasen hemmen kann; diese Hemmung ist aber im Gegensatz zu der Reaktion mit Seringruppen reversibel durch Zugabe von DTT (Whitaker & Perez-Villasenor, 1968).

Tab. 7: Einfluß von PMSF und 1,10-Phenanthrolin

Reagenz	Konz. [mM]	rel. Aktivität [%]		
		A1	A2	A3
ohne	--	100	100	100
PMSF	1	--	103	96
1,10-Phenanthrolin	1	0	0	0

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, blieben A2 und A3 in ihrer Aktivität durch PMSF unbeeinflußt.
Zugabe des Komplexbildners 1,10-Phenanthrolin führte zur völligen Inaktivierung aller drei Enzyme, ein Hinweis auf die Beteiligung von Metallionen am katalytischen Prozess.
Aus Tabelle 8 geht hervor, daß die hemmende Wirkung von 1,10-Phenanthrolin auf A2 durch Zugabe von Mn^{2+} - Ionen völlig reversibel war, während Co^{2+}, Ca^{2+} und Mg^{2+} nur teilweise die Hemmung aufheben konnten und Fe^{2+}, Cu^{2+} und Zn^{2+} keinerlei Einfluß hatten.

Tab. 8: Einfluß von 1,10-Phenanthrolin zusammen mit Metallionen auf Aminopeptidase A2

Metallion	Metallion ohne Phenanthrolin	Metallion nach Phenanthrolin [1mM]	
[5mM]	Aktivität [%]	Aktivität [%]	Reaktivierung [%]
ohne	100	0	0
Mg^{2+}	139	49	35
Ca^{2+}	156	46	29
Mn^{2+}	129	136	105
Fe^{2+}	51	0	0
Co^{2+}	105	87	83
Cu^{2+}	6	0	0
Zn^{2+}	0	0	0

Dialyse der 1,10-Phenanthrolin - haltigen Enzymlösung gegen 10mM Tris - Puffer für 24h führte ebenfalls zur Wiederherstellung der Enzymaktivität.

IV.3.6 Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichte der LNA - Aminopeptidasen wurden durch Gelfiltration an Sepharose 6B ermittelt. Nach Whitaker (1963) besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Quotienten aus Elutions- und Ausschlußvolumen (V_e/V_o) und dem Logarithmus des Molekulargewichtes. Abb. 15 zeigt die so ermittelte Eichgrade für die Sepharose 6B - Säule.

Aminopeptidase A3 wurde im Ausschlußvolumen der Säule eluiert,

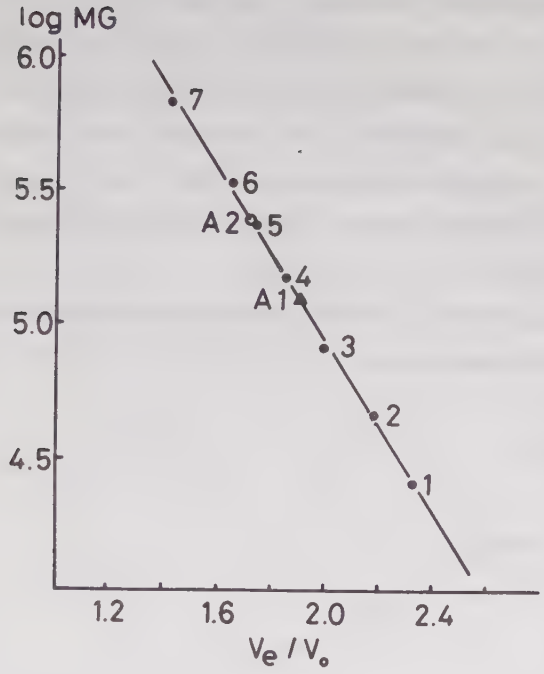


Abb. 15: Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration an Sepharose 6B

Eichproteine: 1) Chymotrypsinogen 2) Eialbumin
3) Kreatinkinase 4) γ-Globulin
5) Pyruvatkinase 6) Ferritin
7) Thyreoglobulin

was auf ein Molekulargewicht von größer als $4x10^6$ hinweist. Für A2 wurde ein Molekulargewicht von 244000 ermittelt, während das Molekulargewicht von A1 122000 betrug.

IV.3.7 SDS - Elektrophoresen

Um weiteren Aufschluß über die Struktur der LNA - Aminopeptidasen zu gewinnen, wurden alle drei Enzyme der SDS - Elektrophorese unterworfen. Die Inkubation in 1% SDS und 1% MCE führt zur Aufspaltung von Disulfidbrücken im Protein; die so entstandenen Peptidketten tragen negative Ladung und zeigen entsprechend ihrem Molekulargewicht unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung Anode.

Die Auswertung der Elektrophoresen wurde nach zwei verschiedenen Methoden vorgenommen:

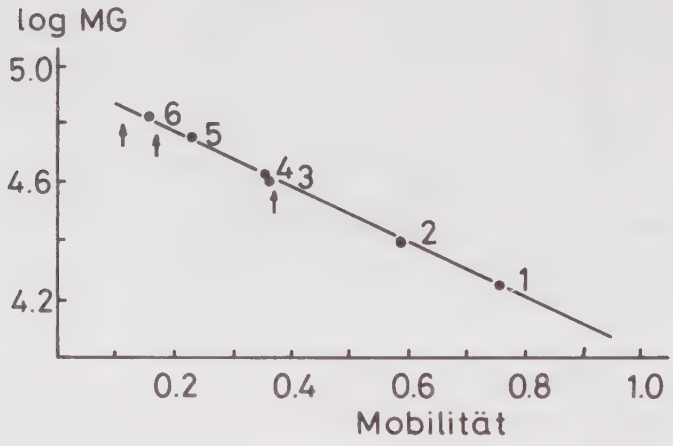


Abb. 16: Molekulargewichtsbestimmung durch SDS - Elektrophorese

a) nach Weber & Osborn für A3

Eichproteine: 1) Myoglobin 2) Chymotrypsinogen
3) Aldolase 4) Eialbumin
5) Pyruvatkinase 6) Rinderserumalbumin

Pfeile zeigen die Lage der Proteinbanden an.

a) Bei der Elektrophorese nach Weber & Osborn (1969) wurden parallel zur Probe Eichproteine bekannten Molekulargewichtes mitgeführt, es besteht eine lineare Beziehung zwischen der Mobilität und dem Logarithmus des Molekulargewichtes (s.III.5.2). Abb. 16a zeigt die entsprechende Eichgrade.

b) Bei Anwendung der Elektrophorese nach Porzio & Pearson (1977) wurden ebenfalls die Eichproteine parallel zur Probe mitgeführt (s.Abb. 17b links), die Eichkurve, die in Abb. 16b dargestellt ist, wurde durch Auftragung vom Logarithmus des Molekulargewichtes gegen die Entfernung der Proteinbande vom Start erhalten.

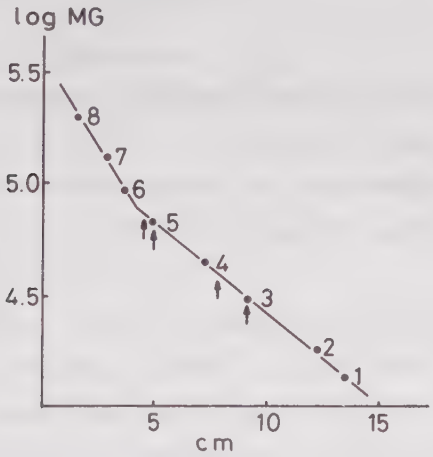
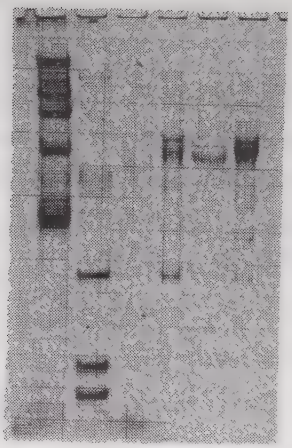


Abb. 16: Molekulargewichtsbestimmung durch SDS - Elektrophorese
b) nach Porzio & Pearson für A1 und A2
Eichproteine: 1) Lysozym 2) SBTI
3) Carboanhydrase 4) Eialbumin
5) Rinderserumalbumin 6) Phosphorylase B
7) ß-Galaktosidase 8) Myosin
Pfeile zeigen die Lage der Proteinbanden an.

a)



b)

A2 A1

Abb. 17: SDS - Elektrophorese der LNA - Aminopeptidasen
a) Aminopeptidase A3
b) Aminopeptidasen A1 und A2; links: Proteinstandards.
Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

Die LNA - Aminopeptidasen A2 und A1 ergaben in der SDS - Elektrophorese fast identische Verläufe (s.Abb. 17b); die Banden von A2 entsprechen Molekulargewichten von 73000, 66000 und 30000, während bei A1 noch eine zusätzliche Bande von 39000 beobachtet wurde. Ebenfalls in Abb. 17 (a) ist die SDS - Elektrophorese von A3 dargestellt, die Proteinbanden - nach Weber & Osborn ermittelt - entsprechen Molekulargewichten von 72000, 64000 und 42000.
Aufgrund der Ergebnisse der SDS - Elektrophoresen von A1 und A2 ist anzunehmen, daß es sich um die monomere und die dimere

Form desselben Enzyms handelt. Weiterhin ist zu diskutieren, ob es sich bei A3 um eine hochmolekulare Aggregation von A1 bzw. A2 handelt. Geht man von einer Untereinheit von 65000 ± 1000 aus, so bedeutet dies, daß A1 mit einem Molekulargewicht von 122000 aus zwei dieser Untereinheiten aufgebaut ist, während A2 gemäß dem Molekulargewicht von 244000 vier dieser Peptidketten enthalten muß. Die Bande bei 72000 entspricht möglicherweise der nicht vollständig reduzierten 65000 - Untereinheit, während die kleineren Peptidstücke (42000, 39000 und 30000) durch weitere Reduktion dieser Untereinheit entstanden sein könnten. Dem entspricht auch die Beobachtung, daß längere Aufbewahrung der Enzymproben in SDS - Puffer/1% MCE zum Auftreten weiterer Bruchstücke mit Molekulargewichten zwischen 40000 und 20000 führte. Ähnliche Befunde wurden auch von Hanson & Frohne (1976) von der LAP aus Rinderaugenlinsen berichtet.

IV.3.8 Assoziation von A2

Bei wiederholten Chromatographien von gereinigter LNA - Aminopeptidase A2 an Sepharose 6B zeigte sich, daß bereits nach dreitägiger Aufbewahrung des Enzyms bei -20°C Assoziation zu einem Enzymkomplex eingetreten war, der wie A3 im Ausschlußvolumen der Sepharose 6B - Säule eluiert wurde (Abb. 18). Die enzymatische Aktivität dieses hochmolekularen Komplexes betrug ca. 10% der A2 - Aktivität. In der SDS - Elektrophorese nach Weber & Osborn zeigte dieser Komplex eine einzige schwache Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 61000.
Diese Befunde legen die Annahme nahe, daß der hochmolekulare Enzymkomplex und eventuell auch A3 unter den experimentellen

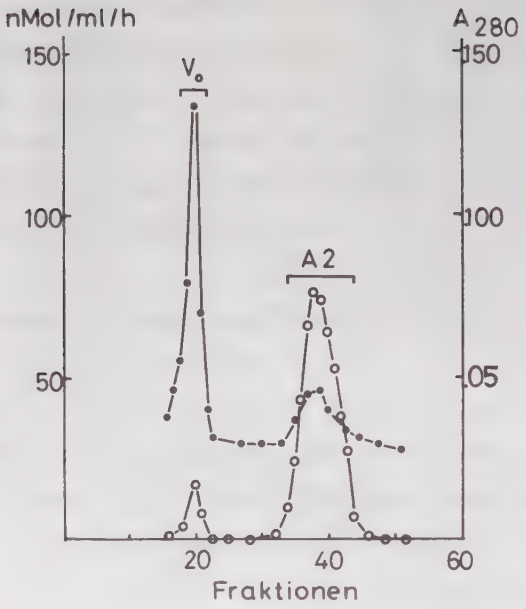


Abb. 18: Assoziation von A2
•: A_{280}
o: LNA

Bedingungen der Aufarbeitung durch Aggregation von A1 oder A2 gebildet werden. Ob A3 identisch ist mit dem hochmolekularen Enzymkomplex, konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden, da das Molekulargewicht außerhalb des Fraktionierbereiches der verwendeten Gelfiltrationen liegt.
Eine Dissoziation des Enzymkomplexes in kleinere Untereinheiten konnte weder bei längerer Aufbewahrung in Tris - Puffer noch nach Inkubation mit 3mM DTT gefunden werden.

IV.3.9 Chromatographie des Rohextraktes an Sepharose 6B

Ausgehend von der Annahme, daß die LNA - Aminopeptidase A3 durch Aggregation von A2 oder A1 unter den gegebenen experimentellen Bedingungen entsteht, erschien es interessant zu klären, auf welcher Stufe der Reinigung diese Aggregation eintritt. Aus diesem Grunde wurde das LNA - Aminopeptidasenmuster im Rohextrakt untersucht. Bei der Chromatographie des Rohextraktes an Sepharose 6B zeigte sich, daß bereits in diesem frühen Stadium der Aufarbeitung alle drei Formen des Enzyms aktiv vorliegen (Abb. 19). Daher ist anzunehmen, daß die Aggre-

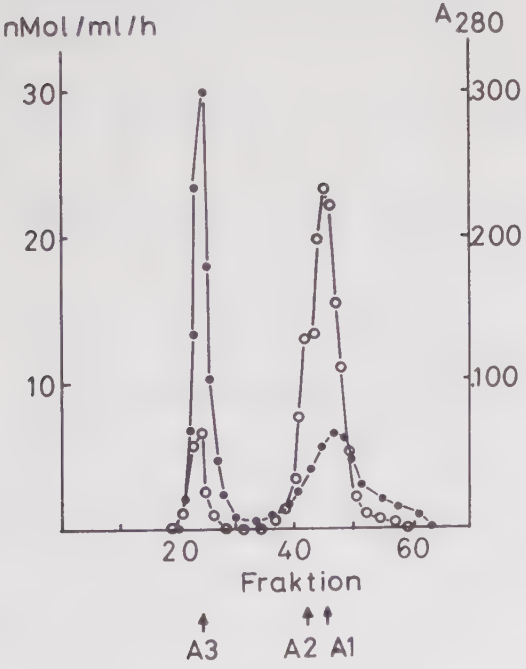


Abb. 19: Chromatographie des Rohextraktes an Sepharose 6B
•: A_{280}; o: LNA

gation zu A3 während der Extraktion der Aminopeptidasen aus dem Rohhomogenat erfolgt. Aufgrund der vorliegenden Experimente kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die hochmolekulare Form A3 auch in vivo existiert.

IV.4 Reinigung der AANA - Aminopeptidase

IV.4.1 Reinigungsschema

Die Reinigung der AANA - Aminopeptidase wurde gemäß der Darstellung in Abb. 20 durchgeführt.

Abb. 20: Reinigungsschema der AANA - Aminopeptidase

Rattenmuskel - Homogenat in 10-fachem Volumen Tris - Puffer

↓

Extraktion bei 2°C über 12h

↓

Zentrifugation bei 10000g, 30 min;
Überstand

↓

Anionenaustauschchromatographie (DEAE Sephadex A-50)

↓

Rechromatographie an DEAE Sephadex A-50

↓

Gelfiltration an Sephadex G-150

IV.4.2 Anionenaustauschchromatographie

Die Chromatographie des Rohextraktes erfolgte wie bereits unter IV.2.1 beschrieben. Die Fraktionen, die mit 0,14M KCl eluiert worden waren und AANA - Hydrolyseaktivität aufwiesen (s. Klammer I in Abb. 7) wurden gepoolt und mit dem gleichen Volumen 10mM Tris/HCl, pH 7,2 verdünnt.

IV.4.3 Rechromatographie an DEAE Sephadex A-50

Die verdünnte Enzymlösung wurde erneut an DEAE Sephadex A-50 chromatographiert, das Elutionsdiagramm ist in Abb. 21 wiedergegeben. Nach Spülung der Säule mit Tris - Puffer erfolgte in zwei Stufen mit 0,1M KCl und 0,14M KCl, beide in Tris - Puffer, die Elution der ANA- und der AANA - Aminopeptidasen. Die enzymatisch aktiven Fraktionen der 0,14M KCl - Stufe (s. Klammer in Abb. 21) wurden gepoolt und durch Ultrafiltration über einer YM 10 - Membran konzentriert.

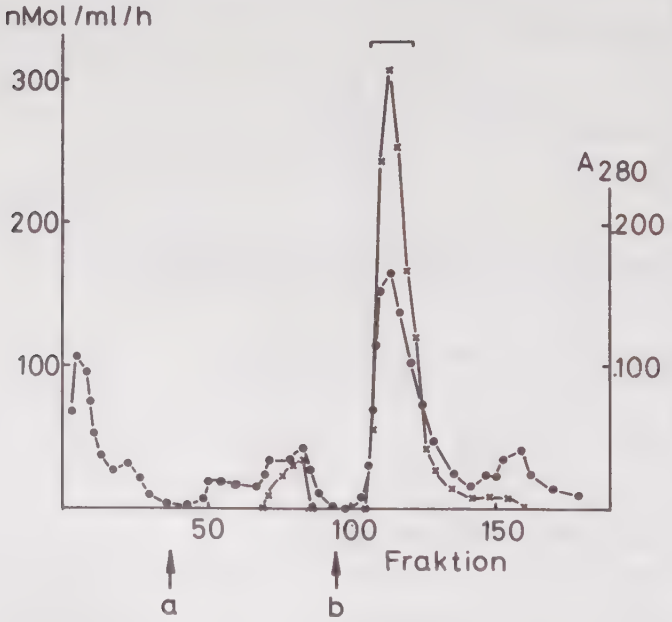


Abb. 21: Rechromatographie an DEAE Sephadex A-50
a) Elution mit 0,1M KCl/10mM Tris/HCl, pH 7,2;
b) Elution mit 0,14M KCl/ 10mM Tris/HCl, pH 7,2.
•: A_{280}; ×: AANA; Klammer: gepoolte Fraktionen

IV.4.4 Chromatographie an Sephadex G-150

Die konzentrierte Enzymlösung wurde an Sephadex G-150 absteigend chromatographiert, der Verlauf der Gelchromatographie ist in Abb. 22 dargestellt. Die AANA - hydrolysierende Aktivität wurde als einheitlicher Peak bei $V_e \approx 185$ ml eluiert. In diesen Fraktionen war keine Aktivität gegenüber den Substraten LNA und ANA meßbar. Die enzymatisch aktiven Fraktionen wurden gepoolt und durch Ultrafiltration über einer YM 10 - Membran konzentriert.

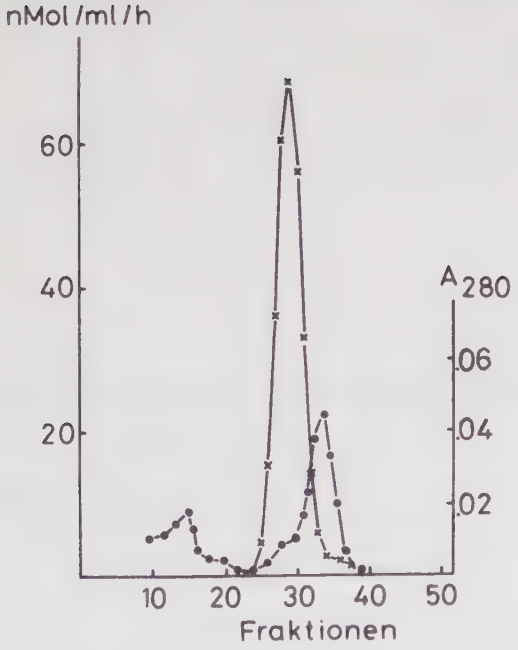


Abb. 22: Chromatographie an Sephadex G-150

•: A_{280} ×: AANA

IV.4.5 Reinigungsfaktoren der AANA - Aminopeptidase

Die Reinigungsschritte für die AANA - Aminopeptidase sind in Tabelle 9 zusammen mit den jeweiligen Reinigungsfaktoren angegeben. Im Vergleich zum Rohhomogenat stieg die spezifische Aktivität im Verlauf der Reinigung bei einer Ausbeute von 24% um das 250-fache.

IV.4.6 Reinheitsprüfung der AANA - Aminopeptidase

Der Reinheitsgrad der AANA - Aminopeptidase - Präparation wurde anhand der Disk - Elektrophorese geprüft, zur Anwendung kam das Mikrosystem mit 7,5% Acrylamidgelen (Maurer - System Nr. 1). Die Abb. 23 zeigt, daß das Enzym als einheitliche Proteinbande zur Anode wanderte.

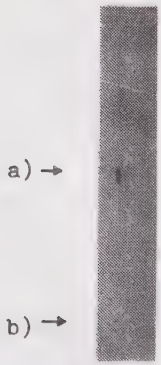


Abb. 23: Mikrodisk - Elektrophorese der AANA - Aminopeptidase
Die Anfärbung des Gels erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue
a) AANA - Aminopeptidase
b) Bromphenolblau

Stufe	Protein [mg]	ges. Aktivität [µMol/h]	spez. Aktivität [µMol/mg/h]	Anreicherung [-fach]	Ausbeute [%]
Homogenat	4111,8	516,2	0,13	1,0	100
Rohextrakt	1630,5	423,3	0,26	2,0	82
1. Anionenaustauscher	53,0	304,6	5,75	44,2	59
2. Anionenaustauscher	10,9	170,3	15,6	120,0	33
Sephadex G-150	4,1	123,3	30,1	231,5	24

Tab. 9: Reinigungsfaktoren der AANA - Aminopeptidase

IV.5. Charakterisierung der AANA - Aminopeptidase

Sämtliche der folgenden Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in pufferfreier Enzymlösung durchgeführt. Dazu wurde das gereinigte Enzym 3x gegen das je 10-fache Volumen H_2O über insgesamt 72h bei 2°C dialysiert. Die Enzymlösung hatte dann einen pH - Wert um 5,5.

IV.5.1 Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung wurde der isoelektrische Punkt des Enzyms mittels Hydrolyse von AANA ermittelt, er liegt bei pH 4,4 ± 0,2 (Abb. 24).

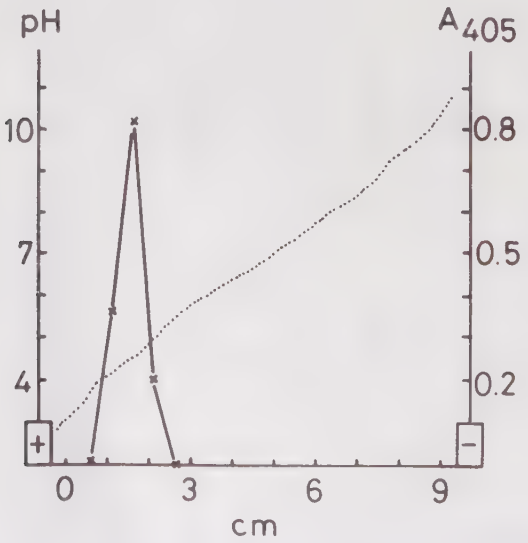


Abb. 24: Isoelektrische Fokussierung der AANA - Aminopeptidase

·····: pH - Gradient ×: AANA

IV.5.2 Einfluß des pH - Wertes

Die Abhängigkeit der Hydrolyserate vom pH - Wert ist in Abb. 25 dargestellt. Als Puffer zur pH - Einstellung wurde Phosphat/Borat/Zitrat/HCl - Puffer (Teorell & Stenhagen, 1938) verwendet. Das Enzym zeigt ein scharfes Aktivitätsmaximum bei pH 5,2.

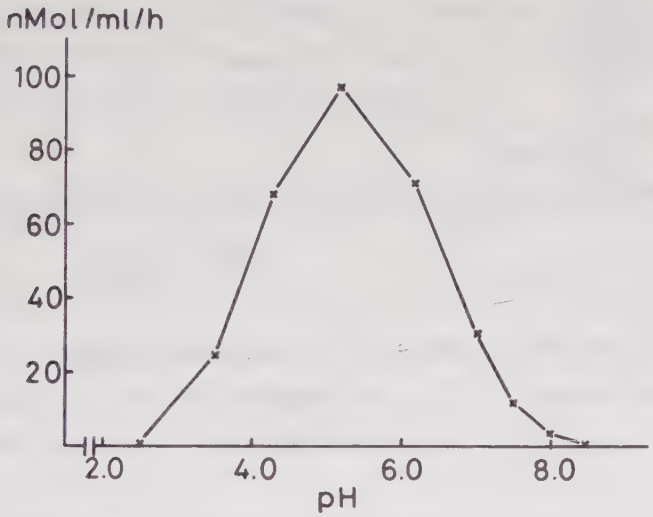


Abb. 25: Einfluß des pH - Wertes

x : AANA

IV.5.3 Kinetik der AANA - Aminopeptidase

Die Umsatzgeschwindigkeit für das Substrat AANA (0,01 - 10mM) wurde sowohl in H_2O als auch nach Zusatz von Tris - Ionen (5mM, pH 5,5) bei je vier verschiedenen Proteinkonzentrationen ermittelt. Bei Substratkonzentrationen oberhalb 0,5mM wurde in H_2O die Enzymaktivität bereits erheblich gehemmt (Abb. 26), während in 5mM Tris eine vergleichbare Hemmung erst bei 10-fach höherer Substratkonzentration beobachtet wurde.

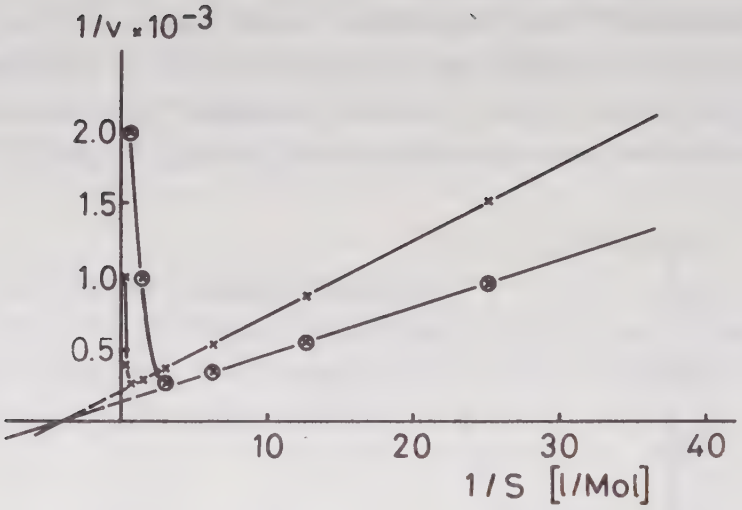


Abb. 26: LINEWEAVER - BURK Plot für das Substrat AANA

⊗: in H_2O ×: in Gegenwart von Tris - Ionen (5mM, pH 5,5)

In Tabelle 10 sind die beiden K_m - Werte angegeben, die Berechnung erfolgte mit Hilfe des LINEWEAVER - BURK Plots.

Tab. 10: K_m und v_{max} der AANA - Aminopeptidase für das Substrat AANA

Medium	K_m [mM]	v_{max} [nMol/min/mg]
H_2O	0,25	7692
5mM Tris/HCl	0,25	4769

Der Vergleich der beiden K_m - Werte zeigt, daß die Aktivität der AANA - Aminopeptidase in beiden Medidien gleich ist, hingegen ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit in H_2O größer.

IV.5.4 Spaltspezifität

Die relativen Hydrolyseraten einiger Substrate durch die AANA - Aminopeptidase sind in Tabelle 11 angegeben. Sowohl gegenüber LNA und ANA als auch gegenüber Azocasein konnte keinerlei Hydrolyseaktivität nachgewiesen werden.

Tab. 11: Spaltspezifität der AANA - Aminopeptidase

Substrat [1mM]	Hydrolyserate [%]
Ala-Ala-4-NA	100
Gly-Phe-4-NA	1
Glu-Phe-4-NA	1
Acetyl-Tyr-4-NA	1
Leu-4-NA	0
Ala-4-NA	0
Azocasein [3mM]	0

IV.5.5 Einfluß von Aktivatoren und Inhibitoren

Der Einfluß von Effektoren wurde gemessen wie bereits unter III.5.5 beschrieben.

IV.5.5.1 Kationen

Kationen übten einen starken Einfluß auf die Aktivität der AANA -

Tab. 12: Einfluß von Kationen

Kation	Konzentration [mM]	Aktivität [%]	
		0,5mM AANA	1,8mM AANA
ohne	--	100	100
Ca^{2+}	1	17	8
	10	2	3
Mg^{2+}	1	23	14
	10	8	4
Mn^{2+}	1	18	10
	10	3	5
Co^{2+}	1	11	84
	10	0	96
Zn^{2+}	1	7	3
	10	7	3
Pb^{2+}	1	1	-
	10	5	-
Fe^{2+}	1	233	310
	10	178	479
Cu^{2+}	1	83	372
	10	20	81
Ag^{+}	1	0	-
	10	1	-
Na^{+}	50	9	9
K^{+}	50	8	7
$Tris^{+}$	50	86	287

Aminopeptidase aus. In Tabelle 12 sind die Restaktivitäten, gemessen bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen, gegenübergestellt. Es zeigte sich, daß bei 1,8 mM AANA Fe^{2+}, Cu^{2+} und Tris - Ionen einen Anstieg der Enzymaktivität verursachten, während alle übrigen zugesetzten Kationen die Aktivität stark hemmten; bei 0,5 mM AANA hingegen bewirkte nur noch Fe^{2+} (1mM) eine Aktivierung des Enzyms.

IV.5.5.2 SH- und SS - Reagenzien

pCMB (1mM) zeigte keinen Einfluß auf die Aktivität der AANA - Aminopeptidase. Daher ist anzunehmen, daß das Enzym keine SH - Gruppen im aktiven Zentrum besitzt, also nicht zur Klasse der Cystein - Proteinasen gehört. Die beiden Thiole MCE und DTT führten zu einer leichten Aktivierung des Enzyms (Tab. 13).

Tab. 13: Einfluß von SH- und SS - Reagenzien

Effektor	Konzentration [mM]	Aktivität [%]
ohne	-	100
pCMB	1	108
DTT	3	136
MCE	1	102
	5	131

IV.5.5.3 PMSF und 1,10-Phenanthrolin

Zusatz von PMSF blieb ohne Einfluß auf die AANA - Aminopeptidase (Tab. 14). Auch die Inkubation mit dem Komplexbildner 1,10-Phen-

anthrolin veränderte die Enzymaktivität nicht. Es ist daher anzunehmen, daß die AANA - Aminopeptidase weder zu den Serin- noch zu den Metalloproteinasen gehört.

Tab. 14: Einfluß von PMSF und 1,10-Phenanthrolin

Effektor	Konzentration [mM]	Aktivität [%]
ohne	-	100
PMSF[1]	1	100
1,10-Phenanthrolin	1	102

[1]Die Vorinkubation mit PMSF erfolgte 60 min bei 25°C, die zugehörige Kontrolle enthielt ebenso wie die Effektorlösung 20% Propanol, was zu einer Inhibition von 78% gegenüber einer wäßrigen Kontrolle führte.

IV.5.6 Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der AANA - Aminopeptidase wurde durch Gelfiltration an Sepharose 6B ermittelt, das Enzym wurde bei V_e = 103 ml eluiert, was einem Molekulargewicht von 154000 entspricht (Abb. 27; Eichgrade s.IV.3.6).

IV.5.7 SDS - Elektrophorese

Die Analyse der AANA - Aminopeptidase unter Disulfid-reduzierenden Bedingungen wurde gemäß der Methode von Weber & Osborn (1969) vorgenommen, die entsprechende Eichgrade ist in Abb. 29 darge-

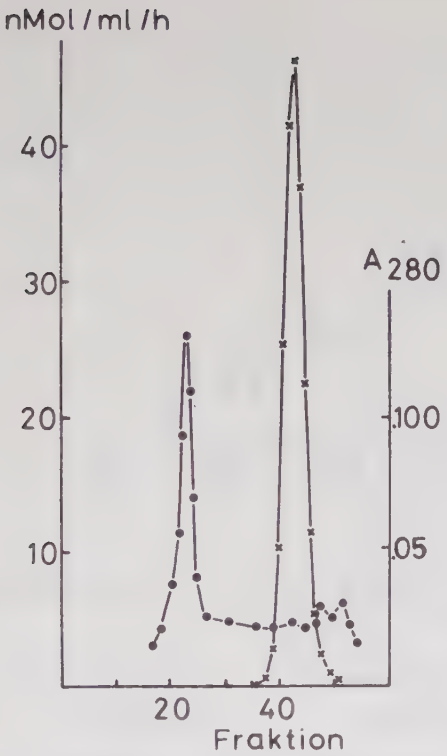


Abb. 27: Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration an Sepharose 6B

•: A_{280}

×: AANA

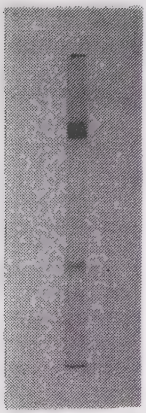


Abb. 28: SDS - Elektrophorese der AANA - Aminopeptidase
Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue

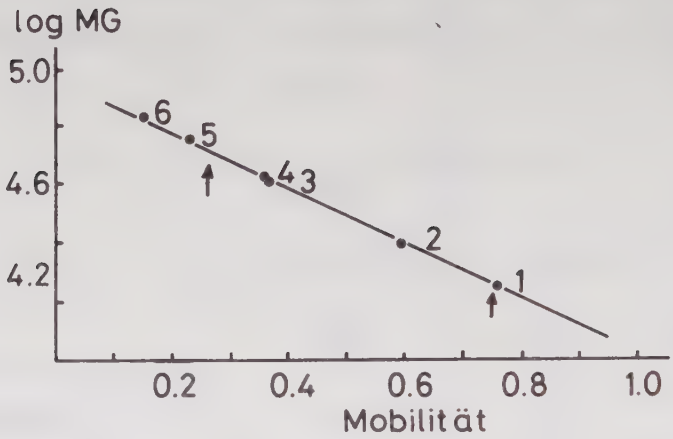


Abb. 29: Molekulargewichtsbestimmung durch SDS - Elektrophorese nach Weber & Osborn (1969)

Eichproteine: 1) Myoglobin 2) Chymotrypsinogen
3) Aldolase 4) Eialbumin
5) Pyruvatkinase 6) Rinderserumalbumin

Pfeile zeigen die Lage der Proteinbanden an.

stellt. Wie in Abb. 28 gezeigt, traten in der SDS - Elektrophorese zwei Banden auf: eine starke Bande entsprechend einem Molekulargewicht von 54000 und eine schwächere Bande, der ein Molekulargewicht von 18000 zuzuordnen ist.

Ein Vergleich mit dem durch Gelfiltration ermittelten Molekulargewicht von 154000 führt zu der Vorstellung, daß das Enzym aus drei identischen Untereinheiten von je 54000 aufgebaut ist, die schwächere Bande bei 18000 entsteht möglicherweise durch weitere Reduktion der 54000er Einheit in drei Peptidketten.

Denkbar ist allerdings auch ein anderes Modell, wonach das Enzym aus je zwei 54000er und zwei 18000er Untereinheiten aufgebaut ist.

V. DISKUSSION

V.1 Vergleich der Aminopeptidasen im Rohextrakt

Studien über die Aminopeptidasenaktivität im Homogenat von Rattenskelettmuskel haben zeigen können, daß die Anwesenheit von mehreren Aminopeptidasen bzw. Arylamidasen sehr wahrscheinlich ist (Parsons & Pennington, 1976). Die vorliegenden eigenen Untersuchungen bestätigten diese Annahme; im Muskelhomogenat ließen sich anhand der Spaltung von LNA, ANA und AANA drei Enzymaktivitäten erfassen, die verschiedene Stabilitäten aufwiesen und sich auch in ihren pH - Optima eindeutig voneinander unterschieden. Alle drei Enzyme benötigten weder KCl noch Detergentien zur Solubilisierung, sind also wahrscheinlich nicht membrangebunden.

Untersuchungen der Aminopeptidasen in Muskelhomogenaten von Ratten, die zuvor mit compound 48/80 behandelt worden waren, ergaben keinerlei Aktivitätsunterschiede gegenüber unbehandelten Tieren, sodaß eine Lokalisation der Aminopeptidasen in Mastzellen ausgeschlossen werden kann (Park et al., 1973).[1)]

Auffallend ist die Hemmung der AANA - Aminopeptidase durch Tris - Ionen in höherer Konzentration. Dieses Phänomen ist bislang nur für die DAP II beschrieben worden (McDonald et al., 1968a,b) und wurde von den Autoren als Charakteristikum bei der Abgrenzung des Enzyms gegenüber anderen Aminopeptidasen herangezogen.

[1)] compound 48/80 ist ein Polymer aus N-Methylhomoanisylamin und Formaldehyd; Injektion dieser Substanz führt zur Degranulation von Mastzellen.

V.2 LNA - Aminopeptidasen

Die Reinigung der LNA - Aminopeptidasen erfolgte in den zwei Hauptschritten Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration. Durch die stufenweise Elution des Anionenaustauschers mit verschiedenen KCl - Konzentrationen konnten sowohl der größte Teil des inaktiven Proteins als auch die ANA- und die AANA - Aminopeptidase abgetrennt werden. Gelfiltration der mit 0,3M KCl eluierten Enzymaktivität an Sephadex G-150 und Sepharose 6B führte zur Auftrennung in drei LNA - spaltende Enzyme mit unterschiedlichen Molekulargewichten; dabei zeigten A1 und A2 mit Molekulargewichten von 122000 und 244000 gute Übereinstimmung mit den bereits bekannten Aminopeptidasen, wie aus Tabelle 15 ersichtlich ist. A3 hingegen fällt auf mit einem Molekulargewicht von größer als 4×10^6.

Zieht man in Betracht, daß die Molekulargewichte von A1 und A2 ein Verhältnis von 1:2 aufweisen und berücksichtigt man weiterhin, daß A2 - wie durch wiederholte Gelfiltrationen an Sepharose 6B nachgewiesen werden konnte - teilweise zu einem Polymer ähnlich wie oder identisch mit A3 assoziiert, so ist anzunehmen, daß A1 zu dem Dimer A2 aggregiert, welches dann zu dem hochmolekularen Enzymkomplex A3 assoziiert. Die These der Assoziation wird unterstützt durch die Beobachtung, daß in früheren Muskelpräparationen, welche in 50mM Tris/HCl, pH 8,5 + 1M KCl durchgeführt wurden, zusätzlich ein Enzymkomplex mit einem Molekulargewicht von ca. 330000 eluiert werden konnte. Dieser Peak, der in den späteren Präparationen aus 10mM Tris - Puffer, pH 7,2 nicht mehr beobachtet wurde, könnte durch Assoziation von A2 mit A1 bzw. von drei Molekülen A1 entstanden sein.

Tab. 15: Molekulargewichte einiger Aminopeptidasen

Enzym	MG	Literatur
LAP (Schweineniere)	300000, 340000	Melbye & Carpenter (1971)
LAP (Rinderaugenlinsen)	326000	Kretschmer & Hanson (1965)
AAP (Leber, human)	235000	Little et al. (1976)
AAP (Niere, human)	235000	Kao et al. (1978)
Arylamidasen (Rattenherz)	I. 257000 II. 105000	Bury et al. (1977)
Arylamidasen (Rattenmuskel)	II. 50000 III. 66000 IV. 309000	Parsons et al. (1979)
Aminopeptidase (Kaninchenmuskel)	160000	Otsuka et al. (1976)
LNA-Aminopeptidase (Rattenmuskel)	A1 122000 A2 244000 A3 > 4 x 10^6	vorliegende Arbeit

Assoziation zu hochmolekularen Enzymkomplexen wurde auch bei der LAP aus Rinderaugenlinsen (Kleine & Lehmann, 1976) sowie bei der Nieren - LAP (Haschen, 1972) beobachtet.
Die Aggregation der Rattenmuskelaminopeptidasen geht einher mit einem Aktivitätsverlust, das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten von A1 : A2 : A3 beträgt annähernd 17 : 5 : 1. Bezüglich der Stabilität erwies sich A2 als stabilste Form der LNA - Aminopeptidasen, während A1 die geringste Stabilität besaß.
Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß die LAP aus Rinderaugenlinsen bei Behandlung mit 1M Harnstoff in zwei Moleküle von je 165000 Molekulargewicht dissoziiert, welche noch 100 - 65% der enzymatischen Aktivität des ursprünglichen Enzyms aufweisen (Kleine & Lehmann, 1976). Ebenfalls wird von der LAP aus Rinderaugenlinsen die Assoziation von zwei 326000 - Einheiten zu einem aktiven Dimer berichtet (Ludewig & Hanson, 1972); die frische Enzympräparation enthielt ca. 1% des Dimers. Nach 6 Monaten war die Aktivität auf 6% angestiegen, Inkubation mit 2mM Mn^{2+} führte zu einer Erhöhung des Dimeranteils auf 9%.

Die Analyse der LNA - Aminopeptidasen in der SDS - Elektrophorese zeigte für alle drei Enzyme ein sehr ähnliches Bild. Ausgehend von einer Untereinheit von 65000 $\pm$ 1000, die sich bei allen drei Formen fand, kann für A1 eine Zusammensetzung aus zwei Peptidketten postuliert werden, während A2 entsprechend einem Molekulargewicht von 244000 vier solcher Peptidketten enthalten muß. Die These, daß A3 durch Aggregation von A2 bzw. A1 entsteht, wird unterstützt durch den Nachweis, daß A3 in der SDS - Elektrophorese in Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 65000 zerfällt.

Untersuchungen an LAP aus Rinderaugenlinsen (Melbye & Carpenter, 1971) sowie aus Schweineniere (Shen & Melius, 1977) ergaben, daß diese Enzyme Hexamerenstruktur besitzen, die Untereinheit weist ein Molekulargewicht von 54000 auf. AAP aus menschlicher Leber und Niere hingegen dissoziiert in zwei identische Untereinheiten von je 118000 Molekulargewicht (Little et al., 1976; Kao et al., 1978).

Im Rahmen der Charakterisierung eines Enzyms ist besonders die Frage nach der Struktur des aktiven Zentrums interessant. Das

Tab. 16: Einteilung der Proteinasen entsprechend ihrem aktiven Zentrum

Inhibitor	Proteinasenklasse			
	Serin-	Cystein-	Aspartat-	Metallo-
Pepstatin (1µg/ml)	-	-	+	-
DFP oder PMSF (1mM)	+	(+)	-	-
pCMB (1mM)	-	+	-	-
1,10-Phenanthrolin (1mM)	-	-	-	+
erwartetes pH - Optimum	7-9	4-7	2-5	7-9

+ : Hemmung - : kein Effekt

aktive Zentrum, das aus einem Katalysezentrum sowie dem Substratbindungs- und -erkennungsort besteht, wird gebildet durch eine bestimmte Aminosäuresequenz und ihre räumliche Konfiguration; einzelne Aminosäuren des Katalysezentrums können durch Verwendung von spezifischen Inhibitoren identifiziert werden.

Entsprechend ihrem aktiven Zentrum werden die Proteinasen, wie in Tabelle 16 dargestellt, in vier Klassen eingeteilt (Barrett & McDonald, 1980).

Alle drei Formen der LNA - Aminopeptidase aus Rattenskelettmuskel werden durch pCMB, das mit Thiolgruppen unter Bildung eines Mercaptids reagiert, in ihrer Aktivität völlig gehemmt; am Beispiel von A1 konnte gezeigt werden, daß diese Hemmung durch Zugabe von MCE reversibel war, wie es für Cysteinproteinasen zu erwarten ist.

Hemmung von Aminopeptidasen durch pCMB wurde auch von einigen anderen Arbeitsgruppen beschrieben, die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengestellt. Im Einzelfall bleibt allerdings zu klären, ob die Hemmung der Enzymaktivität durch Reaktion von pCMB mit einer Sulfhydrylgruppe im aktiven Zentrum oder durch Konfigurationsänderungen des Enzyms nach Bindung von pCMB zustande kommt.

PMSF - ein Inhibitor von Serinproteinasen - blieb ohne Einfluß auf die LNA - Aminopeptidasenaktivität. Dies steht in Übereinstimmung mit den Befunden von Parsons et al. (1979), die ebenfalls keinen Effekt von PMSF auf die Aktivitäten von Arylamidase I und IV nachweisen konnten.

Hingegen sind - wie in Tabelle 18 dargestellt - einige Aminopeptidasen aufgrund ihrer Hemmung durch 1,10-Phenanthrolin als

Tab. 17: Einfluß von pCMB auf die Aktivität einiger Aminopeptidasen

Enzym	pCMB	Literatur
Arylamidasen (Rattenherzmuskel)	I: + II: +	Bury et al. (1977)
Arylamidasen (Rattenmuskel)	I: + II: + IV: +	Parsons et al. (1979)
AAP (Leber)	-	Smith et al. (1965)
LAP (div. Gewebe)	-	DeLange & Smith (1971)
LNA-Aminopeptidasen (Rattenmuskel)	A1: + A2: + A3: +	vorliegende Arbeit

+ : Hemmung - : kein Effekt

als Metallo - Enzyme klassifiziert worden.
Auch für die Aktivität der LNA - Aminopeptidasen aus Rattenskelettmuskel scheinen Metallionen eine wesentliche Rolle zu spielen, da alle drei Formen durch Zugabe von 1,10-Phenanthrolin völlig inaktiviert werden. Am Beispiel von A2 konnte gezeigt werden, daß die Hemmung der Enzymaktivität durch Dialyse gegen Tris - Puffer völlig aufgehoben werden konnte, wahrscheinlich bedingt durch den Verlust von 1,10-Phenanthrolin, was bedeutet, daß der Enzym - Metallion - Komplex stabiler ist als der 1,10-

Tab. 18: Metallo - Aminopeptidasen

Enzym	1,10-Phenanthrolin	Aufhebung der Hemmung	Literatur
LAP (Rinderaugenlinsen)	+	Zn^{2+}	Carpenter & Vahl (1973)
AAP (Leber, human)	+	Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}	Garner & Behal (1974)
Arylamidase (Rattenherz)	I: + II: +	- -	Bury et al. (1977)
Aminopeptidase (Rattenmuskel)	A2: +	Mn^{2+}, Co^{2+}	vorliegende Arbeit

+ : Hemmung - : kein Effekt

Phenanthrolin - Metallion - Komplex. Zugabe von Mn^{2+} oder Co^{2+} führte ebenfalls zur Reaktivierung des Enzyms. Zn^{2+}, Fe^{2+} und Cu^{2+} hingegen bilden zwar auch stabile Komplexe mit 1,10-Phenanthrolin, sind aber zugleich hemmend für die LNA - Aminopeptidasen, sodaß kein Aktivitätsanstieg gefunden werden konnte. Ca^{2+} und Mg^{2+} schließlich, welche normalerweise A2 aktivieren, bilden Komplexe von nur geringer Stabilität mit 1,10-Phenanthrolin und können daher nicht die Hemmung der Enzymaktivität aufheben.

Aufgrund dieser Befunde ist anzunehmen, daß Mn^{2+} oder Co^{2+} (oder ein anderes, nicht untersuchtes Metallion, das mit 1,10-Phenanthrolin einen Komplex vergleichbarer Stabilität bildet) essentiell für die Aktivität der LNA - Aminopeptidasen ist.

Parsons et al. (1979) verwendeten anstelle von 1,10-Phenanthrolin den Komplexbildner EDTA und fanden für die Enzyme II und IV eine starke Aktivierung; ebenso erhielten Bury et al. (1977) eine Aktivierung des Peak I - Enzyms nach EDTA - Gabe, während 1,10-Phenanthrolin die Enzymaktivität hemmte. Dieser scheinbare Widerspruch wird erklärlich, wenn man berücksichtigt, daß beide Arbeitsgruppen Puffer mit Zusatz von 1mM bzw. 0,1mM DTT verwendeten, da EDTA in Anwesenheit von DTT zur Aktivierung von Cysteinproteinasen führt (Barrett, 1977).

Die Charakterisierung eines Enzyms umfaßt auch Untersuchungen zum Einfluß von Metallionen auf die Aktivität. Wie zu erwarten ist der Einfluß von zweiwertigen Kationen auf A2 und A3 nahezu identisch: beide Enzyme werden durch Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} und Co^{2+} aktiviert, während Fe^{2+}, Cu^{2+} und Zn^{2+} inhibierend wirken. Hingegen weist A1 ein anderes Verhalten auf; dieses Enzym wird nur durch Co^{2+} (1mM) aktiviert, während alle anderen getesteten Metallionen die Aktivität hemmen. Umgekehrt wie bei A2 und A3 führt dabei die Erhöhung der Metallionenkonzentration zu einer stärkeren Hemmung der A1 - Aktivität. Es ist möglich, daß durch die höhere Ionenstärke die Assoziation von A1 zu der dimeren Form A2 begünstigt wird; das Dimer A2 besitzt nur 20 - 30% der Aktivität von A1, was in guter Übereinstimmung mit den gemessenen Restaktivitäten steht. Zusätzliche Unterstützung erhält diese Interpretation durch die Beobachtung, daß in 50mM Tris - Puffer, pH 8,5 + 1M KCl, d.h. in einem Puffer mit hoher Ionenstärke das Dimer A2 als die vorherrschende Form der LNA - Aminopeptidase gefunden wurde. Zusätzlich konnte unter diesen Bedingungen ein Trimer nachgewiesen werden.

Große Schwierigkeiten treten auf bei dem Versuch, den Einfluß von Metallionen auf die Aktivität verschiedener Aminopeptidasen bzw. Arylamidasen zu vergleichen, da die Art des Puffers den Effekt von Metallionen stark beeinflussen kann. Dies spielt besonders eine Rolle bei thiolhaltigen Puffern (Zusatz von MCE oder DTT), wie sie von Parsons et al. (1979), Bury et al. (1977) und Otsuka et al. (1976, 1980), d.h. bei allen bisher beschriebenen Muskelarylamidasen verwendet wurden. Thiole bilden nämlich mit Metallionen Komplexe unterschiedlicher Stabilität; für die Stabilität dieser Komplexe gilt in abnehmender Reihenfolge: Hg > Ag > As > Cu >> Fe = Zn = Co = Mo >> Mn = Cd. Die Erdalkalimetalle Ca und Mg binden so schwach an SH - Gruppen, daß kein stabiler Chelatkomplex entsteht (Jocelyn, 1972). Durch die Komplexbildung von Thiol und Metallion wird der stabilisierende bzw. aktivierende Effekt des Thiols auf die Aminopeptidase verringert, was als 'Hemmung' der Enzymaktivität gemessen wird. So fanden Parsons et al. (1979) lediglich für Ca^{2+} und Mg^{2+} (je 1mM) einen geringen aktivierenden Effekt, alle anderen Metalle hemmten die Aktivität. Bury et al. (1977) und Otsuka et al. (1976) fanden bei sämtlichen zugegebenen Metallionen (1mM) in unterschiedlichem Ausmaß Hemmung der Enzymaktivität. Untersuchungen an der LAP aus Rinderaugenlinsen zeigten, daß es sich um ein Enzym handelt, welches Zn^{2+} als Zentralatom besitzt (Kettmann & Hanson, 1970) und durch Mn^{2+} und Mg^{2+} stark aktiviert wird, während Cd^{2+} zur Hemmung der Enzymaktivität führt (Smith & Spackman, 1955). Deutlich davon unterschieden ist die AAP aus menschlicher Leber, welche zwar auch ein Zn^{2+} - Enzym ist, aber lediglich durch Co^{2+} aktiviert wird, während

Mg^{2+} und Ca^{2+} ohne Einfluß auf die Enzymaktivität sind und Zn^{2+}, Cu^{2+} und Ni^{2+} als Inhibitoren wirken (Garner & Behal, 1974).

Über die Funktion der LNA - Aminopeptidase in vivo sowie über die Bedeutung der verschiedenen Formen lassen sich derzeit keine sicheren Aussagen machen. Aufgrund des Extraktionsverhaltens sowie des pH - Optimums von pH 7,3 ist anzunehmen, daß es sich um ein lösliches intrazelluläres Enzym handelt. Die Existenz sowohl einer monomeren als auch einer dimeren Form mit unterschiedlichen Aktivitäten spielt möglicherweise eine Rolle bei der Regulation der Enzymaktivität in der Zelle. Weitere Untersuchungen unter Verwendung von natürlichen Di- und Oligopeptiden als Substrat sind erforderlich, um Klarheit über die Funktion der LNA - Aminopeptidase in der Muskelzelle zu erhalten.

V.3 AANA - Aminopeptidase

Untersuchungen von McDonald et al. (1971) haben gezeigt, daß die Dipeptidylaminopeptidasen in zahlreichen Geweben der Ratte zu finden sind. DAP I und DAP II, welche beide lysosomalen Ursprungs sind, sind besonders aktiv in Leber und Hirn (DAP I) bzw. Schilddrüse und Hirn (DAP II), während DAP III im Pankreas und DAP IV in der Niere die höchsten Aktivitäten aufweisen. Im Skelettmuskel zeigen alle vier Enzyme verglichen mit anderen Geweben relativ geringe Aktivitäten.

Die Analyse der AANA - Aminopeptidase aus dem Rattenskelettmuskel zeigte, daß das Enzym ein Aktivitätsmaximum im sauren pH - Bereich hat und durch Tris - Ionen in seiner Aktivität gehemmt

wird, beides Eigenschaften, die auch die DAP II aufweist (McDonald et al., 1968a b). Ein genauer Vergleich der beiden Enzyme wurde nach der Reinigung der AANA - Aminopeptidase vorgenommen.

Die Isolierung des Enzyms erfolgte durch die Kombination von wiederholter Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration. Durch Elution der Ionenaustauschersäule mit verschiedenen KCl - Stufen konnten sowohl der größte Teil des inaktiven Proteins als auch die LNA- und die ANA - Aminopeptidasen abgetrennt werden. Rechromatographie an DEAE Sephadex A-50 und anschließende Gelfiltration an Sephadex G-150 führten zu einem elektrophoretisch einheitlichen Enzym mit einem Molekulargewicht von 154000.

Die Analyse des Enzyms unter denaturierenden Bedingungen in der SDS - Elektrophorese ergab zwei Proteinbanden mit Molekulargewichten von 54000 und 18000; daraus lassen sich zwei verschiedene Strukturmodelle ableiten:

a) Aufbau aus drei Untereinheiten von je 54000 Molekulargewicht; weitere Reduktion führt zum Auftreten der Bande bei 18000 entsprechend drei weiteren Untereinheiten;

b) Aufbau aus je zwei Peptidketten von 54000 und 18000 Molekulargewicht.

Weitere Untersuchungen müssen Klarheit darüber schaffen, welches der beiden Modelle der tatsächlichen Enzymstruktur entspricht.

Von der DAP II liegen bisher keine Angaben zur Struktur vor, sodaß ein Vergleich nicht möglich ist. Hingegen ist von der DAP IV bekannt, daß das Enzym aus zwei Peptidketten mit je einem Molekulargewicht von 130000 aufgebaut ist (Kenny et al., 1976).

In Tabelle 19 sind einige Eigenschaften der gereinigten AANA - Aminopeptidase im Vergleich mit den vier bekannten Dipeptidyl-aminopeptidasen angegeben.

Auffallend ist, daß sowohl die AANA - Aminopeptidase als auch DAP II durch Kationen stark in ihrer Aktivität gehemmt werden; die Inhibition durch Tris - Ionen wird als typisches Kennzeichen der DAP II angesehen. Der aktivierende Effekt von Fe^{2+}, der für die AANA - Aminopeptidase beobachtet wurde, ist möglicherweise auf Substrateinfluß zurückzuführen. Wurde nämlich der Einfluß von Kationen bei einer höheren Substratkonzentration (1,8 mM AANA), welche bereits stark inhibierend wirkte, untersucht, so führten neben Fe^{2+} auch Cu^{2+} und Tris - Ionen (50mM) zu einem Anstieg der Enzymaktivität.

Über die Natur des aktiven Zentrums der AANA - Aminopeptidase kann derzeit noch keine Aussage gemacht werden. Die Inkubation des Enzyms mit pCMB, PMSF und 1,10-Phenanthrolin blieb in allen Fällen völlig ohne Einfluß auf die Enzymaktivität, lediglich die Anwesenheit von Thiolen führte zu einem leichten Aktivitätsanstieg. Hingegen ist DAP II aufgrund der Hemmung durch DFP als Serinenzym klassifiziert worden (McDonald et al., 1977).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die AANA - Aminopeptidase aus der Skelettmuskulatur der Ratte große Ähnlichkeiten mit der DAP II aus dem Hypophysenvorderlappen des Schweins (McDonald et al., 1968 a,b) aufweist. Über die Funktion des Enzyms in vivo können bislang nur Vermutungen angestellt werden, da die Hydrolyse von natürlichen Substraten nicht untersucht wurde. Sowohl das Extraktionsverhalten als auch das pH - Optimum im sauren Bereich deuten darauf hin, daß

	AANA-Aminopeptidase	DAP I	DAP II	DAP III	DAP IV
Test - Substrat	Ala-Ala-4-NA	Gly-Phe-N	Lys-Ala-N	Arg-Arg-N	Gly-Pro-N
MG	154000	197000	130000	80000	250000
pH - Optimum	4,5 - 6,0	5,0 - 6,0	4,5 - 5,5	8,0 - 9,0	7,5 - 8,5
essentielle Ionen	-	Cl^-	-	-	-
Inhibitoren	Kationen	pCMB, Oxytocin	Kationen	EDTA	Pb^{2+}, Hg^{2+}, Zn^{2+}
Aktivatoren	Fe^{2+}, -SH	-SH, Cl^-	-	-SH	-
aktives Zentrum	?	Cystein	Serin	Serin?	Serin

Tab. 19: Vergleich der AANA - Aminopeptidase mit den vier bekannten Dipeptidylaminopeptidasen (in Anlehnung an McDonald et al., 1971); NA: Nitroanilid; N: Naphthylamid.

die AANA - Aminopeptidase in den Lysosomen lokalisiert ist und dort am Abbau der Proteine und Oligopeptide zu Dipeptiden mitwirkt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Anhand der Spaltung der 4-Nitroanilide von Leucin, Alanin und Alanyl-alanin wurden im Rohextrakt von Rattenskelettmuskel drei Aminopeptidasen untersucht, die sich aufgrund von pH -Optimum, Temperaturabhängigkeit und Stabilität voneinander unterscheiden. Aufgrund des Extraktionsverhaltens sowie der pH - Optima ist anzunehmen, daß es sich bei der LNA- und der ANA - Aminopeptidase um zytosolische Enzyme handelt, während die AANA - Aminopeptidase wahrscheinlich lysosomalen Ursprungs ist.

Die LNA- und die AANA - Aminopeptidase wurden mittels Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration an Sephadex G-150 sowie an Sepharose 6B gereinigt. Dabei gelang es, die LNA - Aminopeptidase in drei verschiedenen, enzymatisch aktiven Formen (A1, A2 und A3) zu isolieren, welche sich sowohl durch ihre Molekulargewichte (A1: 122000, A2: 244000 und A3: $> 4 \times 10^6$) als auch durch ihre Kinetiken bei der Hydrolyse von LNA voneinander unterscheiden, aber in der SDS - Elektrophorese fast identische Proteinbanden von 72000, 65000 und 42000 bzw. 30000 aufweisen. Zudem konnte durch wiederholte Gelfiltration nachgewiesen werden, daß A2 zu einem Polymer aggregiert, welches ähnlich oder gleich A3 ist.

Für die AANA - Aminopeptidase wurde ein Molekulargewicht von 154000 ermittelt, in der SDS - Elektrophorese fanden sich zwei Proteinbanden entsprechend Molekulargewichten von 54000 und 18000.

Die pH - Optima der gereinigten LNA- (pH 7,3) und AANA - Aminopeptidase (pH 5,5) stimmen mit den im Rohextrakt gemessenen Optima überein.

Untersuchungen der Spaltspezifität ergaben, daß alle drei Formen der LNA- sowie die AANA - Aminopeptidase frei von Endopeptidasenaktivität sind; die AANA - Aminopeptidase gehört in die spezielle Gruppe der Dipeptidylaminopeptidasen.
Über die Natur des aktiven Zentrums der AANA - Aminopeptidase besteht noch Unklarheit, hingegen ist für die LNA - Aminopeptidase aufgrund der Inhibierung durch pCMB sowie der Aufhebung der Hemmung durch Zufügen von MCE anzunehmen, daß das Enzym zur Klasse der Cysteinproteinasen gehört. Außerdem sind Metallionen für die LNA - Aminopeptidase zur Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität unerläßlich, Zugabe von 1,10-Phenantrolin überführt das Enzym in die inaktive Apoform.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Anson, M.L. (1938) J.Gen.Physiol. 22, 79

Anson, M.L. (1940) J.Gen.Physiol. 23, 695

Barrett, A.J. (1977) in 'Proteinases in Mammalian Cells and Tissues' (Barrett, A.J. ed.), p.1; North-Holland Publishing Company, Amsterdam

Barrett, A.J. & McDonald, J.K. (1980) in 'Mammalian Proteases' Vol.1 ('Endopeptidases'), Academic Press, New York

Bergmann, M. (1942) Adv.Enzymol. 2, 49

Bouma, J.M.W. & Gruber, M. (1964) Biochem.Biophys.Acta 89, 545

Bury, A.F. & Pennington, R.J. (1973) Biochem.Soc.Trans. 1, 1306

Bury, A.F. & Pennington, R.J. (1975) Biochem.J. 145, 413

Bury, A.F., Coolbear, T.& Savery, C.R. (1977) Biochem.J. 163, 565

Carpenter, F.H. & Vahl, J.M. (1973) J.Biol.Chem. 248, 294

Dahlmann, B. & Reinauer, H. (1978) Biochem.J. 171, 803

Dahlmann, B., Schroeter, C., Herbertz, L. & Reinauer, H. (1979) Biochem.Med. 21, 33

DeLange, R.J. & Smith, E.L. (1971) in 'The Enzymes' (Boyer, P.D., Lardy, H.A. & Myrbeck, C. eds.), 3.Ausgabe, Vol.3, p.81; Academic Press, New York

Erlanger, B.F., Kokowsky, N. & Cohen, W. (1961) Archs.Biochem. Biophys. 95, 271

Filho, J.X. & de Azevedo Moreira, R. (1978) Analyt.Biochem. 84, 296

Garner, C.W. & Behal, F.J. (1974) Biochemistry 13, 3227

Hanson, H., Hütter, H.-J., Mannsfeldt, H.-G., Kretschmer, K. & Sohr, C. (1967) Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 348, 680

Hanson, H. & Frohne, M. (1976) in 'Methods in Enzymology' Vol XLV, Part B, p.504; Academic Press, New York

Hartley, B.S. (1960) Annu.Rev.Biochem. 29, 45

Haschen, R.J. (1972) 'Alaninaminopeptidasen; Biochemie und diagnostische Bedeutung'; Barth - Verlag, Leipzig

Hopsu-Havu, V.K. & Ekfors, T.O. (1969) Histochemie 17, 30

Jocelyn, P.C. (1972) 'Biochemistry of the SH - Group'; Academic Press, New York

Josef, R.L. & Sanders, W.J. (1966) Biochem.J. 100, 827

Kao, Y.J., Starnes, W.L. & Behal,F.J. (1978) Biochemistry 17, 2990

Kar, N.C. & Pearson, C.M. (1976) Clin.Chim.Acta 82, 185

Kenny, A.J., Booth, A.G., George, S.G., Ingram, J., Kershaw, D., Wood, A.R. & Young, A.R. (1976) Biochem.J. 157, 169

Kettmann, U. & Hanson, H. (1970) FEBS Lett. 10, 17

Kleine, R. & Lehmann, J. (1976) Acta biol.med.germ. 35, 331

Kretschmer, K. & Hanson, H. (1965) Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 340, 126

Little, G.H., Starnes, W.L. & Behal, F.J. (1976) in 'Methods in Enzymology', Vol.XLV, Part B, p.495; Academic Press, New York

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fars, A.L. & Randall, R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265

Ludewig, M. & Hanson, H. (1972) Acta biol.med.germ. 29, 539

Lutalo-Bosa, A.J. & McRae, H.F. (1969) J.Food Sci. 34, 401

McDonald, J.K., Reilly, T.J., Zeitman, B.B. & Ellis, S. (1968) J.Biol.Chem. 243, 2028

McDonald, J.K., Leibach, F.H., Grindeland, R.E. & Ellis, S. (1968) J.Biol.Chem. 243, 4143

McDonald, J.K., Callahan, P.X., Ellis, S. & Smith, R.E. (1971) in 'Tissue Proteinases' (Barrett, A.J. & Dingle, J.T. eds.), p.69; North-Holland Publishing Company, Amsterdam

McDonald, J.K. & Schwabe, C. (1977) in 'Proteinases in Mammalian Cells and Tissues' (Barrett, A.J. ed.), p.311; North-Holland Publishing Company, Amsterdam

Maurer, H.R. (1968) 'Disk - Elektrophorese, Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid - Elektrophorese'; de Gruyter, Berlin

Means, G.E. & Feeney, R.E. (1971) 'Chemical Modification of Proteins'; Holden-Day Inc., San Francisco

Melbye, S.W. & Carpenter, F.H. (1971) J.Biol.Chem. 246, 2459

Millward, D.J. (1970) Clin.Sci. 39, 577

Otsuka, Y., Okitani, A., Katakai, R. & Fujimaki, M. (1976) Agric. Biol.Chem. 40, 2335

Otsuka, Y., Okitani, A., Kondo, Y., Kato, H. & Fujimaki, M. (1980) Agric.Biol.Chem. 44, 1617

Park, D.C., Parsons, M.E. & Pennington, R.J. (1973) Biochem.Soc. Trans. 1, 730

Parsons, M.E. & Pennington, R.J. (1976) Biochem.J. 155, 375

Parsons, M.E., Godwin, K.O. & Pennington, R.J. (1979) Int.J. Biochem. 10, 217

Pluskal, M.G. & Pennington, R.J. (1973) Biochem.Soc.Trans. 1, 1307

Porzio, M.A. & Pearson, A.M. (1977) Biochem.Biophys.Acta 490, 27

Shen, C. & Melius, P. (1977) Prep.Biochem. 7, 243

Smith, E.E., Kaufmann, J.T. & Rutenberg, A.M. (1965) J.Biol.Chem. 240, 1718

Smith, E.L. (1948) J.Biol.Chem. 173, 553

Smith, E.L. & Spackman, D.H. (1955) J.Biol.Chem. 212, 271

Swick, R.W. & Song, H. (1974) J.Anim.Sci. 38, 1150

Teorell, T. & Stenhagen, E. (1938) Biochem.Z. 299, 416

Tuppy, H., Wiesbauer, U. & Wintersberger, E. (1962) Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 329, 278

Vanka-Perttula, T. & Kalliomäki, J.L. (1973) Clin.Chim.Acta 44, 249

Wachsmuth, E.D., Fritze, J. & Pfleiderer, G. (1966) Biochemistry 5, 169

Waterlow, J.C., Garlick, P.J. & Millward, D.J. (1978) 'Protein Turnover in Mammalian Tissues And in the Whole Body'; North-Holland Publishing Company, Amsterdam

Weber, K. & Osborn, M.(1969) J.Biol.Chem. 244, 4406

Whitaker, J.R. (1963) Anal.Chem. 35, 1950

Whitaker, J.R. & Perez-Villasenor, J. (1968) Arch.Biochem.Biophys. 124, 70

Herrn Prof. Dr. H. Reinauer danke ich sehr herzlich für die Themenstellung dieser Arbeit und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie für sein stetes Interesse bei der Durchführung der Untersuchungen.

Für die Einführung in die Methoden der Enzymologie, für zahllose kritische Diskussionen und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft möchte ich Herrn Dr. B. Dahlmann besonders danken.

Der Gesellschaft zur Förderung der Erforschung der Zuckerkrankheit danke ich für die finanzielle Unterstützung.

LEBENSLAUF

16.2.1951	Geburt in Düsseldorf
1957 - 1961	Besuch der Dreikönigen - Volksschule in Neuss
1961 - 1969	Besuch des Gymnasiums Marienberg in Neuss
1969	Abitur
1969 - 1974	Studium der Chemie an der Ruhr - Universität Bochum
1971	Ablegung der Diplom - Vorprüfung
1973	Ablegung der Diplom - Hauptprüfung
1973 - 1974	Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Organische Chemie der Ruhr - Universität Bochum
1973 - 1974	Studium der Humanmedizin an der Ruhr - Universität Bochum
1974 - 1975	Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität Ulm
1975	Ablegung des Physikums an der Universität Ulm
1975 - 1976	Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität Essen
1976 - 1980	Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität Düsseldorf
1980	Abschluß des Studiums der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf, Erlangung der Approbation
5.5.1980	Eheschließung mit Herrn Stefan Sturm
15.9.1980	Beginn der Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für klinische Biochemie des Diabetes - Forschungs - Institutes, Düsseldorf